

# **Approches épidémiologiques de l'évaluation du risque sanitaire lié à l'exposition alimentaire à l'Ochratoxin A**

**Emilie Counil**

**Version**

Libre accès

## **POUR CITER CETTE VERSION / TO CITE THIS VERSION**

Emilie Counil, 2005, "Approches épidémiologiques de l'évaluation du risque sanitaire lié à l'exposition alimentaire à l'Ochratoxin A". Paris : Institut National Agronomique Paris-Grignon (AgroParisTech).

**Disponible sur / Available at:**

<http://hdl.handle.net/20.500.12204/SFWRgJsBLL62Ri5N4zpd>



INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE PARIS-GRIGNON

Ecole Doctorale ABIES

THÈSE

pour obtenir le grade de

Docteur de l'Institut National Agronomique Paris-Grignon

Discipline : Épidémiologie

# **Approches épidémiologiques de l'évaluation du risque sanitaire lié à l'exposition alimentaire à l'Ochratoxine A**

présentée et soutenue publiquement par

**Émilie Counil**

le 13 septembre 2005

Directeurs de thèse

Philippe Verger (INRA Mét@risk)

Jean-Luc Volatier (AFSSA DERNS)

Rapporteurs

Dominique Costagliola (INSERM U720) Francis Delpeuch (IRD UR106)

Examineurs

Hassen Bacha (Université du Centre - Tn) Alfred Bernard (UCL - Be)

Estelle Gozlan (INRA Ina P-G)

## JE DIS : M...

### À TOUS LES CHAMPS MAGNETIQUES!

J'aimerais ici nommer toutes celles et tous ceux qui ont accompagné ou simplement croisé mon chemin pendant ces (presque) quatre années, le faisant dévier au gré des caprices d'un sujet que l'on m'a rapidement annoncé comme difficile et « casse-dents » (pour ne pas dire plus), me relevant lorsque je trébuchais, me poussant et tirant lorsque j'étais tentée de m'arrêter tout net, me prenant par le bras pour me faire faire quelques pas en arrière ou changer d'angle de vue, sortir de l'impasse, respirer un air plus frais, bref, celles et ceux sans qui ces pages et pensées n'auraient probablement pas pris cette forme, qui est ce qu'elle est, mais a le mérite d'être là, et de m'avoir tant appris.

L'ordre d'apparition des personnages compte, en général, dans la narration. Bien que je ne puisse m'en affranchir tout à fait, j'aimerais ici faire l'éloge du désordre et du hasard, contingence de la mémoire qui jette les noms sous les doigts sans distinction de classe, ni protocole. Tous sont importants. J'en oublierai sûrement sur le papier, mais ils sont bien là, flottant quelque part dans et entre les lignes.

Au commencement, il y eut une présence, une parole, une confiance. Puis des échanges à bâtons rompus et des encouragements sans cesse renouvelés. Ashod a toujours cru que j'en viendrais à bout, et a été là tout au long de ce sinueux chemin, le suivant de très près, puis de très loin. "Merci" n'est pas le mot approprié, mais permets-moi de le prononcer.

Fort heureusement, je fis la rencontre de l'initiateur scientifique et ordonnateur financier de ces travaux de thèse, Philippe Verger, qui me donna l'opportunité d'entamer et de poursuivre jusqu'au bout ce « passage initiatique » (paraîtrait en effet que je me sois humainement nettement améliorée), acceptant de se lancer dans une coopération avec la Tunisie et d'orienter la thèse sur le "cap épidémiologie" (rebaptisé pour la peine "cap de la bonne espérance"). Je souhaite avant tout le remercier pour la grande liberté qu'il m'a octroyée, et pour la confiance qu'il a placée en moi. Elle fut parfois synonyme de solitude, mais jamais de traversée du désert. Je ne regrette rien.

Jean-Luc Volatier a de son côté eu l'audace de s'engager dans le premier co-financement et co-encadrement de thèse INRA-AFSSA (garde partagée), événement historique (et non chimérique) me mettant un pied dans la recherche, l'autre dans l'opérationnel (qui le gauche, qui le droit, allez savoir, l'essentiel est de ne pas faire le grand écart). Il a toujours répondu à mes appels et j'ai beaucoup appris à son contact (en fait, presque tout ce que je sais sur l'évaluation des expositions alimentaires!). Sa bienveillance et nos discussions me manqueront.

Un grand merci également aux membres de mon comité de pilotage de thèse, mis en place à l'issue du « naufrage de la première année », passée à monter un protocole de repas dupliqués qui n'aura pas dépassé le stade papier. Sylvaine Cordier aura été de très bon conseil et, ce dont je la remercie, soucieuse de mon avenir ; Bénédicte Stengel n'a pas ménagé son temps pour m'aider sur les aspects rénaux de la thèse auxquels je ne connaissais rien de rien ; Françoise Clavel est restée à l'écoute. Nos rendez-vous sur pilotis, loin de la houle, ont été comme une boussole lorsque le vent tournait. Michele Solfrizzo, notre partenaire chimiste italien, fut également impeccablement disponible, patient et toujours amical. Cécile Couchoud accepta de prendre le train du registre en marche alors qu'elle était elle-même lancée à grande vitesse, un franc merci pour sa précieuse relecture.

J'ai eu la chance immense, pendant ces années de thèse, d'effectuer de nombreux voyages en terres tunisiennes. Ce fut ma plus belle expérience humaine. Rencontre avec un pays de contraste, un peuple qui souffre en restant debout, et des enseignants-chercheurs engagés. Hassen Bacha fut le compagnon de toutes les épreuves, pratiques comme poétiques, et je garderai longtemps un souvenir vivant de ces missions, concentrés d'actions et d'émotions, de science et d'amitié. Toute son équipe a épaulé ce travail, en particulier Wafa Hassen, la belle et brillante tunisienne, et Abdellatif Achour, le néphrologue aux mille mosquées. L'équipe terrain de Bou Salem (médecins, infirmiers, laborantins et surveillant général) fit un travail remarquable dans une ambiance chaleureuse lorsque j'appréhendais cette première expérience « managériale », qui plus est à l'étranger. À vous toutes et tous, Léïla fleur des sables, Houda tout feu tout flamme, Adel belle humeur, Abdel-Aziz, Naziha, Fava et Mouldi, un immense sourire en forme de MERCI. Assorti d'une pensée reconnaissante pour les personnes ayant accepté de se prêter à la recherche en faisant pipi dans un petit pot le matin au réveil, chapeau !

Les travaux tunisiens n'auraient bien sûr pas été possibles sans la coopération des partenaires institutionnels. Ministère de la santé publique (Noureddine Cherni et Ichem Trimech en particulier), direction régionale de la santé publique du Nord-Ouest tunisien et hôpital régional de Bou Salem ont transmis les données rénales nationales, donné leur accord officiel, facilité ou très concrètement soutenu le travail de terrain.

La plupart des thésards "scientifiques" français (j'ai ici une pensée émue pour mes homologues "littéraires" et étrangers que je sais être "sans bureau fixe") ont un lieu de travail à eux, un coin de paillasse, parfois même assorti d'un coin de table et d'un ordinateur, pour saisir des résultats et écrire des articles, voire rédiger leur thèse, mais aussi pour rester ouvert sur le monde, connectés en somme. J'ai quant à moi eu la chance de disposer de deux lieux de villégiature qui n'avaient rien du placard ni de la souricière. Travail quotidien, soucis techniques, moments de détente autour d'un café ou d'une douceur, il fit bon se rendre été comme hiver à l'unité Mét@risk de l'INRA et la DERNs de l'AFSSA. Une pensée spéciale pour Gloria Calamassi-Tran, l'élégante, qui m'a très vite ouvert son monde tout de couleurs et de belles lettres ; Sandrine Lioret, la souriante, rayon de soleil et main tendue ; Claire Evans, "the fastest and funniest secretary in the world" ; et Nadine Flavigny, la généreuse, qui pense à tout, à toutes et à tous. Eloïsa, Amélie et Jessica ont su adoucir par de charmants déjeuners les mois de rédaction bien austères de ce printemps-été.

Je remercie également solennellement le portable de Fabien (et son propriétaire avec) de ne pas avoir planté au milieu de mes simulations SAS interminables car mal (c'est-à-dire pas) optimisées.

Et puis, il y a eu les oreilles grandes ouvertes, amis de toujours et d'un jour, Mont Toupkal m'accueillant en pleine tempête comme en mer d'huile à la noisette (la couleur de tes yeux, Nadia), maman et famille inquiètes faisant de leur mieux pour être compréhensives, camarades de théâtre me rappelant au bon souvenir de mon corps et de l'imaginaire quand la tête-bête devenait trop envahissante, bref, celles et ceux qui m'ont maintenue vivante et aimante. Benjamin, ma tourmente et mon repos, que ton nom soit ici couché.

# TABLE GENERALE DES MATIERES

RESUME

LISTE DES ACRONYMES

AVANT-PROPOS..... 1

INTRODUCTION GENERALE..... 2

CHAPITRE 1:  
Registre des Insuffisances Rénales Chroniques Terminales  
Traitées en Tunisie..... 23

CHAPITRE 2:  
Modélisation de l'exposition alimentaire à l'Ochratoxine A  
dans la population française..... 73

CHAPITRE 3:  
Protocole Transversal OTARI..... 123

CONCLUSION GENERALE..... 192

POSTFACE

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

# RESUME

## Contexte et objectif de la recherche

La réalité et l'importance des effets sanitaires de l'exposition à l'ochratoxine A (OTA), une mycotoxine ubiquitaire de l'alimentation, posent encore aujourd'hui de nombreuses questions. L'évaluation du risque lié à l'OTA s'est en effet jusqu'ici essentiellement fondée sur des travaux expérimentaux chez l'animal (néphrotoxicité et cancérogénicité), en raison notamment de difficultés méthodologiques inhérentes à l'étude des risques faibles d'une part et à l'étiologie des affections rénales d'autre part. Notre objectif global est d'apporter de nouveaux éléments qualitatifs et quantitatifs dans l'évaluation du risque lié à l'OTA, ce en adoptant des approches d'observation et de modélisation.

## Matériels et méthodes

Nos recherches s'inscrivent dans les populations française, pour laquelle les résultats de l'évaluation de l'exposition interrogent les méthodes utilisées, et tunisienne, dans laquelle d'une part une affection rénale chronique de type interstitiel et idiopathique est suspectée par certains néphrologues d'être endémique et liée à l'OTA. D'autre part les conditions climatiques et les habitudes alimentaires favoriseraient le développement de moisissures productrices d'OTA et l'exposition à cette toxine.

Nous développons trois approches épidémiologiques : (1) une description de l'incidence des insuffisances rénales chroniques terminales traitées (IRCT) en Tunisie sur la période 1992-2001 s'intéressant notamment aux pathologies primaires (en particulier : néphropathies interstitielles) et aux variations régionales ; (2) un travail de modélisation de l'exposition de la population française avec étude de sensibilité relative à la variabilité des données de contamination et de consommation et à l'incertitude liée au modèle ; (3) la mise en place d'une étude épidémiologique de type transversal et multicentrique en population tunisienne, le protocole OTARI (OTA, Tunisie, Alimentation, Rein, Investigation), dans lequel l'exposition à l'OTA et d'éventuels effets néphrotoxiques infra-cliniques sont recherchés à l'aide d'indicateurs et de marqueurs biologiques.

## Principaux résultats

(1) La transition épidémiologique décrite en Tunisie est visible au niveau rénal *via* l'évolution de l'incidence de l'IRCT au cours des 10 dernières années. En effet, nous observons une importance considérable quoique décroissante des pathologies primaires d'origine infectieuse et une augmentation forte des cas liés à une affection chronique (diabète ou hypertension artérielle). Les causes interstitielles sont également en forte progression, possiblement liées à des expositions toxiques (médicaments et mycotoxines). La prépondérance des causes indéterminées et un accès encore inégal aux soins spécialisés limitent toutefois l'interprétation. (2) La variabilité des données de contamination par l'OTA peut être prise en compte dans l'évaluation de l'exposition par des approches probabilistes de type non-paramétrique, et en choisissant un modèle avec tirage des valeurs de contamination par « occasion de consommation » dans le cas de populations évoluant dans un système agro-alimentaire complexe. Par ailleurs, moyennant l'application d'une méthode de réduction de la variance intra-individuelle des ingérés, trois jours non-consécutifs de consommation suffisent à l'estimation de l'exposition usuelle de la population française à l'OTA. En revanche, l'utilisation de biomarqueurs est recommandée au niveau individuel. (3) L'étude pilote OTARI réalisée sur un échantillon de 59 personnes suggère une exposition faible dans la population d'étude et interroge sur la généralisation de cette tendance à la population tunisienne, sur un effet de calendrier (année et mois), ou sur l'existence de « poches » d'exposition encore à identifier et reliées à des situations de mono-consommation et de précarité générale des conditions de vie.

## Conclusion

Dans l'ensemble, nos résultats, tant méthodologiques qu'opérationnels, suggèrent que l'exposition à l'OTA est faible dans la population française et ne constituerait un facteur de risque potentiel pour certaines néphropathies en population tunisienne qu'en cas de cumul de conditions défavorables au maintien de l'intégrité rénale. Les normes sanitaires relatives à l'OTA illustreraient-elles un certain « paradoxe de la précaution » ?

## LISTE DES ACRONYMES

$\beta$ 2M :  $\beta$ 2-microglobuline  
ADI : Acceptable Daily Intake  
AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments  
AINS : Anti-Inflammatoire Non Stéroïdien  
ALB : albumine  
AMG : Aide Médicale (partiellement) Gratuite  
ANOVA : ANalysis Of Variance  
ATCD : antécédent  
b.w. : body weight  
BMI : Body Mass Index  
CDF : Cumulative Distribution Function  
CI : Confidence Interval  
CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer  
CNI : Caisse Nationale des Indigents  
CNR : Consiglio Nazionale delle Ricerche (Italie)  
CNRPS : Caisse Nationale de Retraite et de Prévoyance Sociale, régime d'affiliation des fonctionnaires d'Etat  
CNSS : Caisse Nationale de Sécurité Sociale, régime d'affiliation des salariés  
CQE : Contrôle Qualité Externe  
CSB : Centre de Santé de Base  
CV: Coefficient of Variation  
CVw : intra-individual coefficient of variation  
D : Day  
DFG : Débit de Filtration Glomérulaire  
DRSSB : Direction Régionale des Soins de Santé de Base  
EER : épuration extra-rénale  
ERA-EDTA : European Renal Association - European Dialysis and Transplantation Association  
FAO : Food and Agriculture Organisation  
GFR : Glomerular Filtration Rate (DFG: Débit de Filtration Glomérulaire)  
HTA : hypertension artérielle  
IARC : International Agency for Research on Cancer  
INCA : Enquête Individuelle et Nationale sur les Consommations Alimentaires  
INRA : Institut National de la Recherche Agronomique (France)  
INS : Institut National de la Statistique (Tunisie)  
INSERM : Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (France)  
IQR : Inter Quartile Range  
IRC : Insuffisance Rénale Chronique  
IRCT : Insuffisance Rénale Chronique Traitée  
ITEM : Istituto Tossine e Micotossine da Parassiti Vegetali, CNR, Bari (Italie)  
JECFA : Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives  
LOD : Limit Of Detection  
LOQ : Limit Of Quantification  
LRSCB : Laboratoire de Recherche sur les Substances Biologiquement Compatibles, Monastir (Tunisie)  
MCS : Monte-Carlo Simulation

ML : Maximum Limit  
MLE : Maximum Likelihood Estimation  
NAG : N-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminidase  
ND : Non-Detects  
Ndiabétiques : néphropathies diabétiques  
NEB : Néphropathie Endémique des Balkans  
NG : néphropathies glomérulaires  
NIC : Néphropathie Interstitielle Chronique  
NICI : NIC Idiopathiques  
NP : Non-Parametric  
NV : Néphropathies Vasculaires, y compris celles liées à une hypertension artérielle  
O : Occasion  
OTA : Ochratoxin A  
OTARI : Ochratoxine Tunisie Alimentation Rein Investigation  
P : Parametric  
p.c. : poids corporel  
PDF : Probability Density Function  
PKR : polykystoses rénales  
pmh : par million d'habitants  
PTWI : Provisional Tolerable Daily Intake  
QFA : Questionnaire de Fréquence Alimentaire  
RBP : Retinol Binding Protein  
RDA : Recommended Daily Allowance  
Sb : between-persons variance  
SCF : Scientific Committee for Food  
SD : Standard Deviation  
SuViMax : Supplémentation en Vitamines et Minéraux  
Sw : within-person variance  
TDI : Tolerable Daily Intake  
TI : Taux d'Incidence  
UI : Unité Internationale  
VTR : Valeur Toxicologique de Référence  
W : Week  
WHO : World Health Organization

Avant propos : la santé vient-elle en mangeant, oui ou non ? Ça dépend...



Augmenter la consommation des féculents: sources d'amidon, notamment des aliments céréaliers (et particulièrement des aliments céréaliers complets qui ont l'intérêt d'apporter des quantités appréciables de fibres), des pommes de terre, des légumineuses, etc. ; ils doivent être présents à chaque repas.

**Figure 1 :** « La santé vient en mangeant » Septembre 2002.  
Un des 8 conseils nutritionnels issus des objectifs du Programme National Nutrition Santé (PNNS).

## Petit déjeuner- 40 céréales analy-

**Appétissantes, équilibrées : les céréales auraient tout pour plaire. Sauf que les promesses nutritionnelles affichées ne sont pas toujours tenues. Pis, nos analyses révèlent d'inquiétantes teneurs en mycotoxines.**

À en croire leurs promoteurs, les céréales du petit déjeuner ont toutes les vertus... ou presque. Elles contribueraient à lutter contre l'obésité des enfants grâce à leur faible teneur en matières grasses. Elles font aussi de l'œil aux adultes, en particulier aux jeunes femmes soucieuses de leur ligne. Les céréales contiennent des fibres, elles sont enrichies en vitamines et minéraux de tous ordres, elles favorisent

Nous avons analysé 21 céréales chocolatées appréciées des enfants et 13 céréales "santé". Nous avons ajouté 4 céréales à base de pétales de maïs pour la recherche des mycotoxines.



## Un café beaucoup trop chargé en ochratoxine A

**L'ochratoxine A (OTA) fait partie des mycotoxines. Il s'agit de toxines qui sont sécrétées par des moisissures avant ou après la récolte. Elle est suspectée de favoriser certains cancers chez l'homme. À une exception près, les teneurs trouvées en OTA ne sont pas trop préoccupantes.**

**4** Nos analyses incitent à ne pas abuser du pain au son et du pain complet, ainsi que de l'ensemble des produits incorporant des raisins secs (pains, muesli...). On retiendra aussi que le café moulu serait globalement plus contaminé que celui en grains. À vos moulins à café !

**Figure 2 :** Des messages médiatiques tantôt alarmistes, tantôt rassurants ou « Vive la contradiction ! ». Montage à partir d'extraits du magazine « 60 millions de consommateurs », n°346 janvier 2001, n°368 janvier 2003, n°387 octobre 2004.

Les images parlant d'elles-mêmes, nous laissons au lecteur le soin d'apprécier la clarté des messages adressés au consommateur français quant aux risques et aux bénéfices qu'il peut attendre de l'adoption de tel ou tel régime alimentaire. Le charme encore discret des questions levées autour des « Céréales et produits céréaliers » (glucides complexes contre mycotoxines) n'est à ce jour qu'une pâle imitation des grandes polémiques « Fruits et Légumes » (vitamines et minéraux anti-oxidants contre pesticides) et « Poissons et produits de la mer » (acides gras oméga3 contre méthylmercure et PCB). Bénéfices et risques sont certes difficiles à apprécier. Nous vous proposons donc de partir à la recherche de faits, en gardant en tête que : "risk is a concept with multiple meanings and is ideologically loaded [...] as it is used in modern society, it cannot be considered a neutral term." (Lupton D. 1993. Risk as moral danger: the social and political functions of risk discourse in public health).

# INTRODUCTION GENERALE

<b>I</b>	<b>RISQUE, PREVENTION ET PRECAUTION .....</b>	<b>3</b>
<b>II</b>	<b>LE RISQUE ALIMENTAIRE.....</b>	<b>4</b>
II.1	Les spécificités de l'agent causal « aliment » .....	4
II.2	Les caractéristiques du risque alimentaire .....	5
II.3	L'analyse du risque alimentaire.....	5
II.3.1	La gestion du risque alimentaire .....	6
II.3.2	La communication sur le risque alimentaire .....	6
II.4	L'évaluation du risque alimentaire .....	7
	Identification des dangers .....	8
	Caractérisation des dangers.....	8
	Évaluation de l'exposition .....	8
	Caractérisation des risques.....	9
<b>III</b>	<b>L'EVALUATION DU RISQUE LIE A L'OTA .....</b>	<b>9</b>
III.1	Les mycotoxines : une grande famille.....	9
III.2	L'ochratoxine A.....	10
III.2.1	Quoi-ça, où-ça ? .....	10
III.2.2	Aperçu de la contamination.....	11
III.2.3	Évaluation du risque lié à l'OTA .....	12
III.3	Les pièces manquantes du puzzle.....	14
<b>IV</b>	<b>LES APPORTS DE L'EPIDEMIOLOGIE .....</b>	<b>15</b>
IV.1	L'épidémiologie, grande absente de l'évaluation des risques ?.....	15
IV.1.1	Des origines de la carence... ..	15
IV.1.2	... à un sursaut ?.....	15
IV.1.3	La toxicologie à l'épreuve de l'extrapolation.....	16
IV.2	L'évaluation épidémiologique des risques .....	16
IV.2.1	Forces et faiblesses de l'observation .....	16
IV.2.2	Des exemples encourageants.....	17
<b>V</b>	<b>DES MOISSURES ET DES HOMMES .....</b>	<b>18</b>
V.1	Acte premier : à la recherche du haricot magique.....	21
V.2	Acte deux : un champignon-modèle .....	21
V.3	Acte trois : partie de campagne .....	21

## I RISQUE, PREVENTION ET PRECAUTION

Le concept de « risque » est devenu central en santé publique, dans un contexte où la modernité réfute le fatalisme de la maladie, du vieillissement et de la mort comme étant le lot de l'existence humaine, simples signes de la finitude de l'homme.

Le « risque » est aujourd'hui utilisé dans différentes acceptions qui renvoient de plus en plus à une volonté de rendre la santé prévisible et par la même contrôlable. De probabilité de survenue d'un événement de santé dans une population sur une période de temps donnée, notion classiquement utilisée en épidémiologie, le « risque » est progressivement devenu « professionnel », « iatrogène », « environnemental » ou « alimentaire », renvoyant en premier lieu à des sources d'exposition aux dangers. Agent biologique, chimique ou physique présent dans l'environnement au sens large et pouvant avoir un effet adverse pour la santé, le danger, une fois identifié, pourrait ainsi être circonscrit, maîtrisé, et finalement « prévenu ». Les acteurs de santé publique s'inscrivent dans cette tension qui vise à repousser au plus loin les limites de la nature, les vaincre si possible, pour le plus grand développement de la santé des populations.

C'est dans le cadre d'un changement de paradigme des risques forts vers les risques faibles et des fortes aux faibles doses d'exposition que le processus d'analyse des risques a vu le jour. Dans un pays démocratique, l'objectif d'un système d'analyse de risque est de permettre aux citoyens de vivre dans une société où, d'une part, les risques qui les préoccupent sont perçus, reconnus et effectivement réduits par les décideurs à un niveau socialement accepté et, d'autre part, les risques qu'ils ne perçoivent pas font l'objet d'une vigilance efficace permettant de les détecter et d'alerter les citoyens suffisamment tôt : le risque collectif est une affaire d'État.

L'analyse des risques est une démarche de prévision-mitigation-communication, principalement des risques faibles, le plus souvent en situation d'incertitude. Elle procède à un recensement qualitatif et/ou quantitatif des problèmes potentiellement liés à un type d'exposition dans une optique de screening destiné à ne prendre en considération que les expositions pour lesquelles une intervention serait susceptible de faire diminuer le risque de maladie dans la population considérée, ou d'éviter l'augmentation du risque dans le cas de substances introduites volontairement (additifs alimentaires par exemple).

En ce sens, la démarche d'analyse du risque se place d'emblée sur le terrain de la prévention primaire au niveau des populations, telle que décrite et défendue par Geoffrey Rose dans son très vivant ouvrage : « The strategy of preventive medicine » (Rose G. 1992). Rejoignant Doll sur l'importance des risques faibles (Doll 1996), Rose insiste en particulier sur le continuum qui existe entre le normal et la pathologique, pourtant classiquement envisagés sous un angle binaire (présence ou absence de la maladie). Ce continuum, relié à l'inégale distribution des expositions dans les populations, poserait la question suivante : « small but widespread risks : a public health disaster ? ». La relation dose réponse observée entre cholestérol sérique et mortalité cardio-vasculaire tendrait par exemple à illustrer le fait que : « a large number of people exposed to a small risk may generate many more cases than a small number exposed to a high risk ».

C'est cependant précisément dans ces zones de faibles expositions-faibles risques que la relation dose-réponse est difficile à estimer, chez l'homme comme chez l'animal. Chez l'homme, une puissance statistique insuffisante dans la plupart des études épidémiologiques génère des observations négatives masquant les effets réels, ou tout au moins ne permettant

pas de se prononcer sur la réalité des effets et le seuil à partir duquel ils se manifestent, lorsqu'il existe (Doll R. 1996). Chez l'animal, des doses très élevées sont mises en œuvre afin de susciter des réponses mesurables, nécessitant d'opérer des extrapolations des fortes aux faibles doses forcément empreintes d'incertitude. Nouveau changement de paradigme : l'incertitude de l'évaluation scientifique place alors les propositions de gestion des risques sur le terrain de la précaution, et non plus de la prévention, en dehors des effets de bord.

L'arène du « risque alimentaire », dans laquelle notre démarche de recherche évolue, n'échappe pas à cette « culture de la précaution » développée en réponse à un certain nombre de dysfonctionnements ayant suscité scepticisme voire crise de confiance dans le modèle standard d'évaluation des risques, modèle que Chevassus-au-Louis qualifie de positiviste, quantitatif, réductionniste et technocratique (Chevassus-au-Louis B. 2001) et que nous présentons ici.

## II LE RISQUE ALIMENTAIRE

Le risque alimentaire paraît être soudainement entré dans la catégorie des risques majeurs pour l'homme. L'encéphalopathie spongiforme bovine (« vache folle ») et la forme spécifique de la maladie de Creutzfeld-Jacob chez l'homme qui pourrait lui être associée, a constitué un traumatisme important pour l'opinion, que les épisodes plus récents (et finalement plus meurtriers) de salmonelloses, listérioses et autres colibacillooses, ou encore de dioxines, sont venus renforcer. Parallèlement, tous les indicateurs de santé s'accordent sur une augmentation régulière de l'espérance et de la qualité de vie dans les pays développés, et ne montrent aucune rupture récente de cette tendance. Notre alimentation n'aurait jamais été aussi saine qu'en ce passage au XXI<sup>ème</sup> siècle. C'est dire si la dimension psychologique et sociologique de l'alimentation, et notamment la valeur symbolique de l'aliment, soulignée par les sociologues, contribue à faire du risque alimentaire un risque très particulier, à forte charge émotionnelle. En effet, au-delà du risque sanitaire proprement dit, les réactions de peur ou de rejet intègrent tout un ensemble de conditions sociologiques, économiques et environnementales dans lesquelles les aliments sont produits, transformés et consommés. L'ouvrage de Martin Hirsch, ancien directeur général de l'AFSSA, illustre avec humour les rouages de « ces peurs qui nous gouvernent » (Hirsch M. 2002).

### II.1 Les spécificités de l'agent causal « aliment »

Marian Apfelbaum souligne dans l'introduction de son ouvrage sur les « Risques et peurs alimentaires » la triple spécificité objective du risque alimentaire : nous y sommes tous exposés car nous mangeons tous ; les preuves expérimentales sont indirectes et ne concernent qu'un tout petit nombre d'ingrédients ; ce risque n'est que difficilement quantifiable, du fait même que nous exigeons qu'il soit nul (Apfelbaum M. 1998).

L'alimentation constituant une contingence physiologique absolue, tout individu est soumis au risque alimentaire. Sa liberté ne s'exerce qu'au travers du choix des différents aliments auxquels il a accès du fait de leur disponibilité ou de leur coût.

L'aliment est à la fois source de vie en tant que pourvoyeur des nutriments indispensables au développement et à la subsistance de l'individu, et source de déséquilibres éventuellement graves lorsqu'il n'est pas utilisé avec discernement par celui-ci (sur ou sous-consommation et consommation sélective se traduisant par des excès ou des carences). Il est redouté et stigmatisé en tant que vecteur de risques chimiques et biologiques :

- situé au terme d'une chaîne alimentaire complexe d'origine animale ou végétale, l'aliment

convoie des substances naturelles toxiques biosynthétisées par les plantes (alcaloïdes, phytoestrogènes, substances anti-nutritionnelles), les moisissures (mycotoxines) et les algues (phycotoxines), ainsi que des contaminants environnementaux (plomb, cadmium, dioxines), des résidus de substances intentionnelles utilisées en production végétale (pesticides) et animale (additifs, médicaments vétérinaires) et en technologie alimentaire (additifs à l'alimentation humaine), regroupés sous l'appellation de " xénobiotiques " ;

- l'aliment peut en outre être contaminé aux différents stades de sa production, de sa transformation et de sa conservation par des microorganismes pathogènes (bactéries et virus), voire des agents non conventionnels (prions).

L'aliment étant complexe dans sa composition, un très grand nombre de molécules issues du monde végétal ou animal et présentes en faibles quantités ne sont pas même identifiées. Un nombre important et croissant d'aliments résulte d'un processus de " cracking " de matières premières (lait, maïs, soja) puis d'assemblage des produits dérivés, opérations susceptibles de diluer ou de concentrer certains xénobiotiques. L'alimentation d'un individu est encore plus complexe dans la mesure où elle consiste en un assemblage variable d'aliments particuliers. Si sa diversité accroît l'éventail des risques potentiels, elle en diminue globalement l'incidence quantitative.

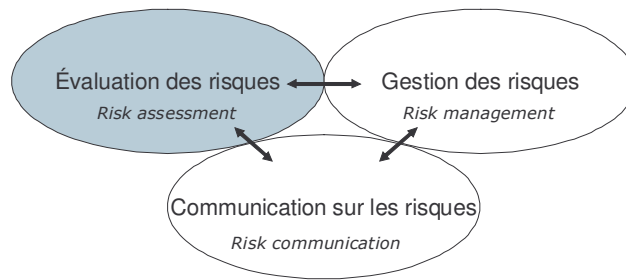
## II.2 Les caractéristiques du risque alimentaire

Le risque alimentaire est donc multiforme, associé à des agents chimiques et biologiques intentionnellement, involontairement ou accidentellement présents dans les aliments. Il peut être immédiat dans le cas des allergies et des toxi-infections alimentaires, ou différé dans le temps s'agissant de processus de cancérisation ou de dégénérescence neurophysiologique. Il peut être violent dans le cas du choc anaphylactique lié à une réaction allergique et de certaines intoxications, ou beaucoup plus insidieux et se traduire par une lente dégradation de certaines fonctions vitales.

Le risque alimentaire consiste dans une interaction entre un agent complexe et variable (l'aliment) et le fonctionnement intime d'un organisme vivant (l'homme en l'occurrence). La grande variabilité individuelle liée aux facteurs génétiques, physiologiques et environnementaux, a pour conséquence des réactions extrêmement diverses aux toxiques et aux agents biologiques agresseurs. Des catégories de population (jeunes individus, personnes âgées, personnes malnutries, immunodéprimées ou présentant des types génétiques particuliers, des situations physiologiques ou géographiques spécifiques) seront selon les cas placées en situation favorable ou défavorable par rapport aux risques associés à une alimentation déterminée.

## II.3 L'analyse du risque alimentaire

Le processus d'analyse du risque comporte trois composantes illustrées en figure 1. L'évaluation des risques qui nous intéresse en premier lieu est une étape scientifique de détermination des effets toxiques connus ou potentiels pouvant résulter de l'exposition de l'homme à des aliments porteurs de dangers chimiques ou biologiques.



**Figure 1** : La démarche d'analyse du risque : évaluation, gestion, communication.

Avant que de revenir sur le détail de l'évaluation, nous présentons brièvement les démarches de gestion et de communication qui complètent le processus d'analyse du risque.

### II.3.1 La gestion du risque alimentaire

La gestion du risque est le processus, distinct de l'évaluation des risques, consistant à mettre en balance les différentes politiques possibles en consultation avec toutes les parties intéressées, en tenant compte de l'évaluation des risques et d'autres facteurs ayant une importance pour la protection de la santé des consommateurs et la promotion des pratiques commerciales loyales. Ultiment, la gestion du risque consiste à choisir les moyens de prévention de la contamination (précaution) et de contrôle appropriés.

Les mesures de gestion du risque alimentaire relèvent en premier lieu de l'application de mesures à grande échelle : fixation de normes sanitaires et mise en place d'un système de surveillance de leur mise en application. Ces mesures ne pouvant être prises qu'au niveau global et ne comportant pas de contrainte individuelle (ni vaccination, ni changement de comportement tel que le port de la ceinture de sécurité notamment) sont comparables à la fluoration de l'eau de boisson et aux mesures réglementaires en faveur du contrôle de la pollution atmosphérique. La responsabilité de leur mise en œuvre incombe à l'État (établissement de recommandations et de lois, surveillance de leur mise en application, "sanctions" dans le cas contraire). Le seul levier d'action directe du citoyen-consommateur pour minimiser les risques auxquels il serait exposé est ainsi de diversifier son alimentation, conseil « de bon sens » d'ailleurs largement relayé par les nutritionnistes, y compris dans le cadre du programme national nutrition santé (PNNS) lancé en 2001.

### II.3.2 La communication sur le risque alimentaire

La communication sur le risque est définie comme un échange interactif, tout au long du processus d'analyse du risque, d'informations et d'opinions sur les risques, les facteurs liés aux risques et leurs perceptions, entre les responsables de leur évaluation et de leur gestion, les consommateurs, l'industrie, les milieux universitaires et les autres parties intéressées. Elle consiste notamment (idéalement) en l'explication des résultats de l'évaluation des risques et des fondements des décisions prises en matière de gestion des risques.

En France par exemple, les avis (évaluations et éventuellement propositions de gestion des risques) émis par l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) sont rendus publics par leur publication sur le site internet de l'agence ainsi que dans des communiqués de presse.

Le rôle de la presse se limite à ce titre rarement à un simple relai objectif d'informations objectives, comme suggéré en avant-propos. L'amplification et le brouillage médiatique de

messages scientifiques certes contradictoires ont largement participé au déclenchement et à l'atteinte d'un climax dans la crise de la vache folle. Les médias relayent également les tentatives des pouvoirs publics pour rétablir la confiance des consommateurs-électeurs (figure 2). Cette fonction ambiguë de médiation entre scientifiques, décideurs et citoyens est aujourd'hui un champ de recherche tout à fait passionnant.



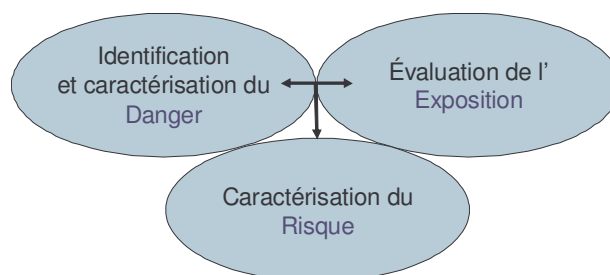
**Figure 2 :** Mangeurs de bœuf.

John Gummer (Ministre britannique de l'agriculture) et Cordelia (sa fille de 4 ans). 16 Mai 1990. BBC News.

#### II.4 L'évaluation du risque alimentaire

Les bases internationales d'une méthode rationnelle d'évaluation des risques chimiques et biologiques associés à l'alimentation ont été discutées lors d'une Consultation *ad hoc* d'experts mixtes FAO/OMS (JECFA: Joint Expert Committee on Food Additives and Contaminants) réunis à Genève en 1995 pour traiter de l'application de l'analyse de risques aux aliments. Cette initiative du *Codex Alimentarius* (commission créée en 1963 par la FAO et l'OMS afin d'élaborer des normes alimentaires, des lignes directrices et d'autres textes, tels que des Codes d'usages) résultait d'une part des préoccupations croissantes des opinions publiques en matière de sécurité des aliments, et d'autre part des dispositions prévues par l'Accord SPS (Accord sur l'Application des Mesures Sanitaires et Phytosanitaires) de l'Acte Final de l'Organisation Mondiale du Commerce (OMC), spécifiant que les normes, lignes directrices et recommandations du *Codex Alimentarius* reflètent un consensus international en ce qui concerne les exigences minimales pour la protection de la santé humaine en regard des risques alimentaires.

Cette consultation a établi une démarche d'évaluation du risque alimentaire en quatre étapes illustrées à la figure 3 et que nous présentons point par point.



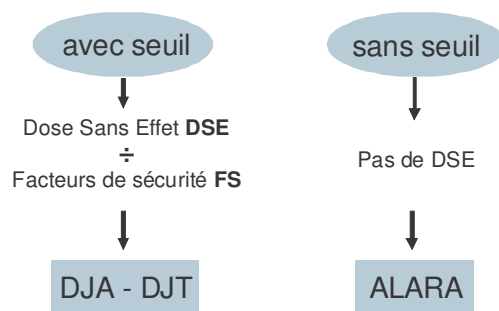
**Figure 3 :** La démarche d'évaluation du risque : danger, exposition, risque.

## Identification des dangers

Elle consiste en l'identification des agents biologiques, chimiques et physiques susceptibles de provoquer des effets adverses pour la santé et qui peuvent être présents dans un aliment donné ou un groupe d'aliments. Elle s'appuie d'une part, lorsqu'elles sont disponibles, sur les résultats d'études épidémiologiques, voire cliniques, et d'autre part sur des études conduites chez l'animal *in vivo* ou sur des modèles mécanistiques *in vitro*.

## Caractérisation des dangers

Elle repose sur l'évaluation qualitative et/ou quantitative de la nature des effets adverses pour la santé associés aux dangers identifiés dans les aliments *via* la caractérisation de la relation dose-réponse (ou effet). Elle s'appuie pour ce faire essentiellement sur la toxicologie alimentaire qui permet de définir si le toxique a un effet à seuil ou sans seuil et de l'estimer. La toxicologie met en œuvre des doses très élevées afin de solliciter des réponses expérimentalement appréciables. L'extrapolation d'espèce et de dose est classiquement réalisée par l'application de facteurs de sécurité (par défaut : 100) à la dose sans effet observable la plus basse (DSE : Dose Sans Effet) tirée d'un ensemble de tests toxicologiques validés et mettant en œuvre un échelonnement de doses de la substance testée. Le choix de ces facteurs est du domaine de la gestion du risque. Il détermine qualitativement l'importance du risque résiduel incompressible socialement ou individuellement « acceptable ». Dans le cas des substances présentant un effet sans seuil (cancérogènes génoxiqes), le principe ALARA (As Low As Reasonably Achievable) est appliqué. La figure 4 illustre le principe de détermination de la valeur toxicologique de référence (VTR), généralement une Dose Journalière (ou Hebdomadaire) Tolérable (DJT-DHT) pour les contaminants, appelée Dose Journalière Admissible (DJA) pour les substances volontairement ajoutées. Cette dose est définie comme la quantité, exprimée par kilogramme de poids corporel, qu'un individu peut ingérer quotidiennement sa vie durant sans encourir de risque pour sa santé.



**Figure 4** : La caractérisation du danger : relation dose-effet ou dose-réponse.  
DJT : dose journalière tolérable ; DJA : admissible ; ALARA : as low as reasonably achievable.

## Évaluation de l'exposition

C'est l'évaluation qualitative et /ou quantitative de l'ingestion probable d'agents biologiques, chimiques ou physiques par le biais des aliments, ainsi que par suite de l'exposition à d'autres sources, le cas échéant. De nombreuses approches, des plus approximatives aux plus raffinées, existent actuellement. Nous n'évoquons ici que deux exemples parmi les possibles :

- L'exposition maximale de la population est calculée en fixant *a priori* les niveaux de contamination aux *limites maximales de résidus* (LMR) définies (autorisées) pour chacune des denrées animale ou végétale susceptibles de renfermer la substance considérée, et en prenant en compte les consommations maximales des différents groupes de population. Cette évaluation par excès est généralement très conservatrice puisqu'elle postule une consommation quotidienne de la substance durant toute la vie de l'individu, aux doses les plus élevées permises. Les LMR s'appliquent en outre aux denrées non transformées, et ne tiennent pas compte des phénomènes de dilution, ou au contraire de concentration, pouvant résulter des processus technologiques appliqués aux aliments ;
- La distribution des expositions dans la population est estimée en prenant en compte la contamination réelle des aliments consommés (moyennes ou distributions), qui intègre parfois l'incidence des processus technologiques appliqués aux aliments (enquêtes de type "panier de la ménagère" ou "repas dupliqués"), ainsi que la variabilité des comportements alimentaires.

Nous aurons l'occasion de montrer que cette étape comporte de nombreuses difficultés méthodologiques, sources de grandes incertitudes.

### Caractérisation des risques

Étape finale de l'évaluation des risques reposant sur les trois étapes précédentes, la caractérisation des risques est l'estimation qualitative et /ou quantitative, compte tenu des incertitudes inhérentes à l'évaluation, de la probabilité de survenue des effets adverses connus ou potentiels sur la santé, également fonction de la gravité, dans une population donnée. Pour les substances chimiques présentant un seuil de toxicité, la probabilité d'effets adverses sur la santé est par définition négligeable si l'exposition est inférieure à la DJA/DJT. En ce qui concerne les substances chimiques pour lesquelles il n'est pas possible de fixer un tel seuil (cancérogènes génotoxiques), le risque pour la population est le produit du potentiel toxique (cancérogène) par l'exposition.

Au terme de cette présentation générale du risque alimentaire, de ses particularismes et des modalités de son analyse, nous entrons dans le vif du sujet qui nous réunit aujourd'hui, et invoquons enfin un petit nom barbare: Ochratoxine A (allias : OTA).

## III L'ÉVALUATION DU RISQUE LIÉ À L'OTA

### III.1 Les mycotoxines : une grande famille

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires sécrétés par des moisissures appartenant essentiellement aux genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*. Ce sont des toxines naturelles des denrées alimentaires. Les principales familles présentant une importance agro-économique et des effets délétères sur la santé humaine prouvés ou suspectés sont : les aflatoxines, les ochratoxines, les fumonisines, certains trichothécènes, la zéaralénone et la patuline (Creppy 2002; Hussein and Brasel 2001).

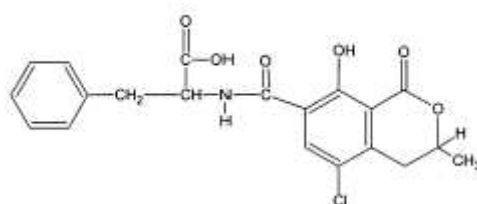
Ces contaminants ubiquitaires de l'alimentation humaine et animale peuvent être produits avant la récolte et/ou pendant le stockage des denrées alimentaires et se retrouvent principalement dans les céréales, le café en grains, les haricots, les légumineuses, les fruits secs, mais aussi dans la bière, le vin, les jus de fruits et les produits animaux (lait, œufs, viande) par transfert *via* l'alimentation animale (Pitt J.I. 2000). La FAO estime ainsi à 25% la proportion des denrées mondiales contaminées annuellement par les mycotoxines. Or, les

procédés alimentaires usuels (cuisson, lyophilisation, congélation, irradiation) ne peuvent en général au mieux que détruire partiellement la plupart des mycotoxines présentes dans les aliments (Bullerman et al. 2002; Park 2002; Ryu et al. 2002; Scott 1996). L'exposition humaine se ferait donc essentiellement par ingestion d'aliments contaminés.

## III.2 L'ochratoxine A

### III.2.1 Quoi-ça, où-ça ?

La structure chimique de l'ochratoxine A (OTA) est rapportée à la figure 5. Il s'agit d'un anion organique, le 3-méthyl-5-chloro-8-hydroxy-3,4-dihydroisocoumarine (un dérivé de la coumarine) lié à la phénylalanine (L-β-phénylalanine) par une liaison amide (Van der Merwe K.J. et al. 1965).



**Figure 5** : Structure chimique de l'Ochratoxine A.

L'OTA est produite par une seule espèce du genre *Penicillium* (*P. verrucosum* : Pitt 1987) et par diverses espèces du genre *Aspergillus* (*A. ochraceus*, *A. carbionarius* et plus rarement *A. niger* : Abarca et al. 1994; Teren et al. 1996; Van der Merwe K.J. et al. 1965). Ces espèces diffèrent par leurs niches écologiques, les denrées sur lesquelles elles se développent et produisent de l'OTA et leur fréquence d'apparition dans différentes régions géographiques, comme l'illustre le tableau 1.

Espèce productrice	Conditions écologiques optimales de croissance	Denrées contaminées (directement ou indirectement)	Régions concernées
<i>P. verrucosum</i>	0 °C ≤ θ (température) ≤ 31 °C optimum : 20 °C a <sub>w</sub> (activité de l'eau) ≥ 0,8	Céréales, produits céréaliers, viande et abats de porc	Régions tempérées (Canada, Europe Centrale et du Nord)
<i>A. ochraceus</i>	8 °C ≤ θ ≤ 37 °C optimum 24-31 °C a <sub>w</sub> ≥ 0,79 optimum 0.95-0.99 2.2 ≤ pH ≤ 10 optimum 3-10	Nombreuses denrées stockées et déshydratées : café vert grain (séchage au soleil), poisson fumé et séché, fruits secs, haricots secs, noisettes, cacahuètes, amandes, céréales	Régions tropicales, subtropicales et méditerranéennes
<i>A. carbionarius</i>	θ ≤ 40 °C optimum 32-35 °C a <sub>w</sub> ≥ 0,82 à 25-30 °C	Raisin de table, raisins secs, vin, café	

**Tableau 1** : Denrées et régions concernées par la contamination à l'OTA en fonction de l'espèce microbienne. a<sub>w</sub> : activité de l'eau. θ : température (°C).

Il est à noter que les conditions optimales de production de l'ochratoxine A par chacune de ces espèces sont encore mal connues et peuvent différer des conditions optimales de

croissance de ces moisissures. Ainsi, tandis qu'il est admis que l'infection des denrées par les moisissures peut se produire aussi bien au champ que pendant le stockage, la synthèse post-récolte de métabolites secondaires est considérée comme le facteur principal de contamination des denrées à l'OTA.

### III.2.2 Aperçu de la contamination

L'OTA a été détectée dans pratiquement tous les types de céréales - dont le maïs, le blé, le sorgho, le riz, le seigle, l'orge et l'avoine – et a été retrouvée dans de nombreuses autres denrées : graines de soja, haricots, grains de café vert, produits cacaotés, vin et jus de raisins, raisins secs, bière, épices et herbes, reins de porc et boudins (Pittet 2001).

On ne dispose actuellement pas de données de contamination pour tous les pays qui sont potentiellement concernés au vu de leurs conditions climatiques et/ou de pratiques agricoles particulières. En effet, d'après le recensement international effectué par le Comité mixte d'experts FAO/OMS (JECFA), la majorité des données de contamination actuellement disponibles proviennent de l'Europe (85% des 23 167 échantillons testés proviennent de Croatie, Danemark, Finlande, France, Allemagne, Italie, Pays-Bas, Norvège, Espagne, Suisse et Grande-Bretagne), tandis que l'Amérique du Sud (7%, Brésil et Uruguay), l'Amérique du Nord (6%, Canada et Etats-Unis), l'Afrique (1%, Sierra Leone et Tunisie) et l'Asie (1%, Dubai et Japon) sont sous-représentées. En outre, la comparaison internationale des données de contamination est rendue difficile par l'absence fréquente de procédures standardisées d'échantillonnage et d'analyse chimique, d'où une hétérogénéité des méthodes et des limites de détection obtenues. Le tableau 2 présente une synthèse des données récentes (Pittet 2001). Pour une revue des données antérieures à 1995, se reporter à la référence International Programme on Chemical Safety (1990).

Aliment	Pays	Echantillons positifs/Total (%)	Variations (µg/kg)
Blé	Suisse	15/28 (54%)	0.10-10.00
Blé	Danemark	165/520 (32%)	0.05-51.00
Blé et orge	GB	41/1061 (4%)	1.00-33.00
Blé et orge	USA	55/486 (11%)	0.20-31.40
Seigle	Danemark	256/616 (42%)	0.05-121.00
Avoine	Danemark	40/92 (43%)	0.05-5.60
Céréales <sup>a</sup>	GB	63/300 (21%)	0.10-17.80
Maïs grains	Croatie	46/209 (22%)	0.20-614.00
Café vert	Japon	14/47 (30%)	0.10-17.40
Café vert	GB	110/291 (38%)	0.20-27.30
Produits cacaotés	GB	50/60 (83%)	0.10-2.40
Vin	Allemagne	60/144 (42%)	0.01-7.00
Raisins secs <sup>b</sup>	GB	286/301 (95%)	0.10-40.80
Epices et herbes <sup>c</sup>	GB	25/29 (86%)	1.20-50.40

a : dont blé (148), orge (131) et avoine (21).

b : dont raisins (101), raisins de Corinthe (100) et raisins de Smyrne (100).

c : dont piments en poudre, curry, tandoori, gingembre, ail et 5 autres épices en poudre.

**Tableau 2 :** Quelques données récentes de contamination des denrées alimentaires par l'OTA. D'après Pittet 2001.

On constate que la fréquence et les niveaux de contamination varient en fonction des denrées, des pays et de l'année considérés, mais que la contamination des aliments par l'OTA est relativement ubiquitaire et courante. Ainsi, la consommation d'aliments contaminés serait

responsable d'une exposition chronique à des doses variables d'OTA dans de nombreuses régions du monde. Il convient cependant de noter que la voie respiratoire est depuis peu envisagée comme voie possible d'exposition complémentaire en zone agricole (Richard et al. 1999; Skaug et al. 2001) et en milieu professionnel (Iavicoli et al. 2002).

### III.2.3 Évaluation du risque lié à l'OTA

#### Identification du danger

Initialement incriminée dans la survenue de néphropathies en élevage porcin (Krogh and al. 1973), cette mycotoxine présente des effets néphrotoxiques chez toutes les espèces mammifères testées expérimentalement (WHO 2002). Elle a été classée dans le groupe 2B du CIRC (IARC 1993), c'est-à-dire qu'il existe des preuves suffisantes de sa cancérogénicité expérimentale chez l'animal (avec comme sites le rein et le foie) mais des preuves insuffisantes chez l'homme (IARC 1993). L'OTA est donc considérée comme "possiblement cancérogène" chez l'homme en attendant l'apport de preuves épidémiologiques. Le caractère génotoxique n'a pu être montré par les tests conventionnels de mutagénicité et demeure encore controversé (O'Brien and Dietrich 2005).

L'implication étiologique de l'OTA dans la survenue d'une entité nosologique endémique dans les Balkans - la Néphropathie Endémique des Balkans (NEB), néphropathie tubulo-interstitielle chronique - a été évoquée dès 1976 (Krogh and Elling 1976) et étudiée par diverses équipes de recherche sans qu'aucune conclusion claire n'ait pu être tirée (Tatu and al. 1998). Cette affection semble être multi-factorielle (Toncheva and al. 1998), la nature (initiation et/ou progression) et l'importance du rôle de l'OTA restant incertains (Pfohl-Leskowicz and al. 2002).

#### Caractérisation du danger

Deux types de caractérisation du danger ont été menés, l'un à partir des données de néphrotoxicité et l'autre sur la base du caractère cancérogène.

À partir de l'étude ayant mis en évidence la dose avec effet la plus basse (LOAEL :Lowest Adverse Observed Effect Level) chez l'espèce la plus sensible au niveau rénal (le porc) et appliquant un facteur de sécurité de 500, une Dose Hebdomadaire Tolérable Provisoire (DHTP) de 112 ng/kg poids corporel/semaine a été proposée par le comité mixte d'experts FAO/OMS (WHO 1991) et arrondie à 100 ng/kg poids corporel/semaine (WHO 1995) qui correspond à une Dose Journalière Tolérable Provisoire (DJTP) d'environ 14 ng/kg poids corporel/jour.

Reprenant les propositions canadiennes (Kuiper-Goodman 1996) et nordiques (NNT 1991) basées sur la cancérogénicité de l'OTA, l'homologue européen du JECFA, le Scientific Committee on Food (SCF), s'est quant à lui prononcé en 1998 en faveur d'une DJT de 5 ng/kg poids corporel/jour (SCF 1998) correspondant à un niveau de risque de 1 :100 000 (application d'un facteur de sécurité de 5000 à la TD05, dose à laquelle 5% des animaux testés développent une tumeur : Kuiper-Goodman 1999).

La réalité (identification du danger) et l'importance (caractérisation du danger) des effets sanitaires liés à l'ingestion d'OTA étant largement inconnues chez l'homme, les conclusions précédentes se fondent uniquement sur les observations et expérimentations animales.

## Évaluation de l'exposition

La synthèse la plus récente de l'exposition des populations européennes rapportée au tableau 3 a été publiée dans la dernière tâche SCOOP (Scientific Cooperation Task) (Miraglia and Brera 2002) à partir du recensement des données de consommation et de contamination au niveau national dans douze pays d'Europe.

Pays	Exposition moyenne à l'OTA (ng/kg p.c./jour)	
	Population	Consommateurs
Allemagne (>14 ans)	1.09 (1.16)	-
Danemark	1.19 (1.77)	-
Espagne	1.18 (1.39)	-
Finlande	1.71 (3.66)	-
France (15 à 65 ans)	-	2.31 (2.65)
GB (>16 ans)	0.53 (1.87)	0.91 (2.15)
Grèce	0.15 (1.32)	-
Italie	1.13 (1.22)	3.52 (3.61)
Norvège	-	0.97 (1.61)
Pays-Bas	1.59 (2.42)	1.26 (3.30)
Portugal	0.81 (1.16)	-
Suède	-	1.42 (1.60)

Consommateurs : consommations non nulles. Entre parenthèses, moyennes estimées en remplaçant les données manquantes de consommation et de contamination par la moyenne européenne.  
p.c. : poids corporel.

**Tableau 3** : Exposition moyenne à l'OTA dans différents pays Europe.  
D'après Miraglia and Brera 2002.

Les principaux contributeurs à l'exposition européenne dans son ensemble sont les céréales, (44%) suivies des jus de fruits et autres (15%), du vin (10%), du café (9%), de la bière (7%), du cacao et ses dérivés (5%), des fruits secs (4%), de la viande (3%) et des épices (3%).

### Caractérisation du risque

Peu de pays de l'UE ont réalisé une évaluation du risque lié à l'OTA à partir des données nationales au de-là des résultats rapportées plus haut. Or les percentiles élevés d'exposition n'étant pas rapportés dans la tâche SCOOP (2002), la comparaison aux valeurs toxicologiques de référence rapportées plus haut ne peut se faire sur cette base.

Dans un rapport détaillé, les Pays-Bas ont par exemple calculé un percentile 99 de 28 ng/kg p.c./semaine (Bakker M. and Pieters M.N. 2002) très inférieur à la DHTP de 100 ng/kg p.c./semaine du JECFA ainsi qu'aux 35 ng/kg p.c./semaine du SCF.

En France, le 95<sup>ème</sup> percentile d'exposition a été estimé à 2.59 ng/kg p.c./jour chez les personnes âgées de 18 ans et plus (Verger P. et al. 1999), ne présentant donc pas à première vue de problème particulier, à l'exception des enfants de 2 à 17 ans pour lesquels le P95 était de 6.94. Toutefois, la publication en 2002 d'une évaluation quantitative du risque lié à l'OTA dans la population française et fondée sur des approches probabilistes du calcul de l'exposition a soulevé des doutes importants (Gauchi and Leblanc 2002). En effet, en fonction de la méthode utilisée, les percentiles élevés d'exposition variaient dans des proportions alarmantes (cf. tableau 4), interrogeant la méthode adoptée auparavant (déterministe simple)

et la probabilité réelle de dépasser la DJT la plus élevée (14 ng/kg p.c./jour) dans la population française.

Paramètre	Enfants	Femmes	Hommes
Moyenne	4.83←5.85→7.20	2.77←3.04→3.42	3.16←3.50→4.02
E.T.	5.67←9.44→14.63	2.99←3.88→4.83	3.14←4.27→5.50
P95	14.07←20.50→29.56	7.84←9.73→12.05	8.57←10.82→14.08
P99	28.08←49.21→76.92	15.35←20.96→27.57	16.16←23.22→33.70

**Tableau 4** : Exposition à l'OTA dans la population française.  
En ng/kg p.c./jour. D'après Gauchi and Leblanc (2002).

### III.3 Les pièces manquantes du puzzle

Ce rapide aperçu des connaissances (et méconnaissances) relatives au risque lié à la consommation d'OTA nous permet de dégager trois catégories de questions soulevant d'importantes incertitudes scientifiques.

#### À propos de l'identification du danger chez l'homme

L'OTA constitue-t-elle un véritable danger chez l'homme ? C'est-à-dire l'exposition à l'OTA est-elle associée à une augmentation du risque de pathologie rénale (tubulo)interstitielle (par exemple la NEB) et/ou de cancer du tractus urinaire (rein, vessie, uretère) dans certaines populations ?

#### À propos de la caractérisation du danger chez l'homme

Dans le cas de la néphrotoxicité, existe-t-il un seuil ?

Dans le cas de la génotoxicité, quel est le potentiel cancérigène ?

#### À propos de l'évaluation de l'exposition/caractérisation du risque

Quelle(s) méthode(s) choisir pour estimer la distribution des expositions, et de là, la probabilité de dépassement de la DJT, dans une population donnée ?

L'examen de ces questions nous a amenés à ancrer nos recherches sur l'OTA dans des populations humaines et à développer pour ce faire différentes approches épidémiologiques afin d'apporter des éléments de réponse qualitatifs et quantitatifs faisant à ce jour défaut.

Dans sa dernière évaluation, le JECFA préconisait en particulier, afin de mieux cerner le risque associé à l'OTA (WHO 2002) :

- De réaliser des études d'exposition dans d'autres régions que l'Europe dont la majorité des données de contamination émane ;
- De mener des études épidémiologiques explorant le rôle éventuel de l'OTA dans la survenue de pathologies rénales chroniques.

Après une présentation succincte des apports escomptés et avérés de l'épidémiologie en évaluation des risques, nous nous proposons de construire une démarche élargie d'évaluation du risque lié à l'OTA dans laquelle l'épidémiologie (re)trouve sa place.

## IV LES APPORTS DE L'EPIDEMIOLOGIE

### IV.1 L'épidémiologie, grande absente de l'évaluation des risques ?

L'utilisation de données épidémiologiques dans l'évaluation quantitative des risques mise en œuvre par l'Environmental Protection Agency (US-EPA) à des fins la réglementation environnementale est encore rare à la fin des années 90 (Calderon 2000; Hertz-Picciotto 1995). Le même constat a été dressé plus récemment pour l'évaluation des risques liés aux contaminants chimiques et aux substances volontairement introduites dans les aliments (van den Brandt et al. 2002). Les auteurs cités plaident en faveur d'une plus grande place accordée aux données obtenues chez l'homme dans l'étape d'évaluation des risques devant aboutir à des mesures de gestion (coûts financiers) et de communication sur les risques (coûts sociétaux tels que la création de psychoses, climat favorable au déclenchement des crises).

#### IV.1.1 Des origines de la carence...

Le processus d'analyse du risque appliqué à l'environnement puis à l'alimentation s'est construit dans un contexte où des mesures réglementaires devaient être prises rapidement et où l'information épidémiologique était rare. Peu de temps et de ressources étant disponibles pour mettre en place des études *ad hoc* en population humaine, l'expérimentation animale présentait de réels avantages : coût modéré, rapidité à tester une hypothèse, variété des plans expérimentaux, possibilité de randomisation et de contrôle de différents facteurs, standardisation des limitations et incertitudes donnant confiance aux expérimentateurs dans l'extrapolation de leurs résultats. L'épidémiologie ne s'est donc pas vu attribuer de rôle formel dans l'étape d'évaluation des risques. Cette « exclusion dans l'œuf » s'est compliquée d'un dialogue difficile entre disciplines expérimentale et d'observation.

#### IV.1.2 ... à un sursaut ?

Les coûts des normes environnementales définies sur des bases expérimentales allaient (et vont toujours) cependant croissant. Les conséquences économiques et plus largement sociétales de mesures prises en carence de données permettant d'apprécier leurs bénéfices en termes de santé publique sont ainsi progressivement devenues affaire de responsabilité collective, et en particulier politique. Il est à ce titre intéressant de citer l'un des grands artisans de l'épidémiologie au XX<sup>ème</sup> siècle, Sir Richard Doll, déclarant (Doll 1981) : "An epidemiological perspective starts not with 10 000 chemicals that pollute a particular area, but with 10 000 deaths that occur in that area each year and seeks to determine the major causes of those actual deaths. Such a perspective is much more likely to overlook a large number of small effects of various chemicals than laboratory science might be, but it is much less likely to overlook the chief determinants of current mortality rates, and trends." Ce souci de caractériser en priorité les principaux déterminants de l'état de santé tel qu'observé dans différentes populations, c'est-à-dire les risques « forts », suggère la place que pourrait jouer l'information épidémiologique dans le cadre d'une priorisation des enjeux de santé publique faisant intervenir observations en populations, données expérimentales, et participation des citoyens dans le cadre d'une « démocratie sanitaire ». Nous sommes encore loin du compte.

### IV.1.3 La toxicologie à l'épreuve de l'extrapolation

Dans le cas de substances nouvelles volontairement introduites dans les denrées destinées à l'alimentation humaine, par exemple les additifs alimentaires, la démarche expérimentale est parfaitement adaptée à un *screening* des molécules qui alimente la décision de mise sur le marché. Elle permet ainsi de prévenir l'introduction de substances dangereuses dans la chaîne alimentaire, sauf lorsque l'homme est l'espèce la plus sensible, ou au contraire est moins sensible que le modèle animal utilisé (une molécule inoffensive est alors interdite de séjour).

Les données expérimentales sont également indispensables dans l'élucidation des mécanismes de pathogénèse chez l'animal et chez l'homme.

L'utilisation des seules données expérimentales comme outil d'identification des dangers et de caractérisation des relations dose-réponse dans le cas de composés dont la présence n'est pas souhaitée dans l'alimentation mais est difficilement évitable soulève cependant un certain nombre de problèmes, inhérents à la nécessité d'extrapoler des fortes aux faibles doses, d'une voie d'administration à une autre, et d'une espèce animale à l'homme.

La quasi-totalité des études de toxicité à moyen et long terme utilisent en effet des doses très supérieures aux niveaux théoriques d'exposition humaine calculés à partir des données de contamination et des données d'enquêtes alimentaires actuellement disponibles.

La voie d'administration choisie dans les études *in vivo* est par ailleurs variable - injection veineuse, injection péritonéale, gavage, incorporation dans les repas (voie alimentaire) - ce qui affecte la toxico-cinétique du xénobiotique. En particulier, les aliments constituent une matrice extrêmement complexe au sein de laquelle des interactions peuvent se produire avec le toxique étudié ; l'interprétation des études ayant utilisé une voie d'administration autre que la voie alimentaire pose donc problème en toxicologie alimentaire.

L'extrapolation des résultats toxicologiques entre espèces, et en particulier d'espèces animales diverses à l'homme, pose en outre question en raison de différences physiologiques (toxico-cinétique et toxico-dynamique) mal connues.

Une approche purement toxicologique ignore enfin la complexité des mécanismes conduisant à la survenue effective, pour une exposition particulière (dose, durée, distribution, âge à la survenue de la première exposition), d'une pathologie chez des individus soumis à de nombreux facteurs de risque et de protection. Les résultats obtenus chez l'animal n'ont donc pas forcément de valeur prédictive quant à l'évolution possible des effets toxiques mis en évidence vers un état morbide chez l'homme.

Les mesures réglementaires prises au nom de la santé publique sur la base d'extrapolations multiples ayant, nous le savons bien, des légitimités diverses et des corollaires économiques et sociétaux parfois importants, le souci de vérifier leur pertinence sanitaire à l'échelle des populations nous semble pleinement justifié.

## IV.2 L'évaluation épidémiologique des risques

### IV.2.1 Forces et faiblesses de l'observation

Bien que la démarche épidémiologique d'évaluation des risques ne soit pas aussi formelle que celle dite d'« évaluation quantitative des risques » (EQR) fondée sur les données expérimentales, les avantages et apports potentiels de l'épidémiologie sont multiples (voir tableau 5).

Avantages	Limitations
Le risque observé dans une population extrapolé à une autre population varie généralement d'un facteur 2 à 3 (facteur 100 entre l'animal et l'homme)	Le temps nécessaire à la production de résultats valides est long
Les effets observés correspondent à la plage de variation réelle des expositions en populations humaines	Le coût de la réalisation d'études à grande échelle est élevé
Des voies d'exposition multiples et complexes sont intégrées simultanément	La tendance à la sur-interprétation d'un résultat positif ou négatif par des « non initiés » est réelle
Les facteurs endogènes de variabilité (génétiques, hormonaux et autres) sont pris en compte	Le risque d'erreur pour les risques faibles est élevé

**Tableau 5 :** Quelques forces et faiblesses de l'épidémiologie. D'après Calderon (2000).

Après avoir plaidé pour l'étude prioritaire des risques forts, Doll reconnaît l'importance potentielle des associations faibles en termes de santé publique (risques relatifs compris entre 1 et 3). Il insiste cependant sur le fait que les rôles du hasard et les erreurs systématiques, dont les biais de confusion, sont difficiles à écarter (Doll R. 1996). Si le talon d'Achille de la démarche expérimentale réside dans l'extrapolation, celui de l'épidémiologie est largement localisé du côté d'un manque de puissance générateur de faux négatifs laissant le vrai dans le flou.

#### IV.2.2 Des exemples encourageants

Deux exemples parmi d'autres nous semblent illustrer l'intérêt des approches épidémiologiques dans l'évaluation du risque alimentaire : les aflatoxines et le méthylmercure.

Dans le cas des aflatoxines, l'épidémiologie est intervenue à toutes les étapes et, fait rare, permet finalement une évaluation quantitative des risques dans les populations où l'exposition peut être estimée correctement. Des études écologiques réalisées à partir des années 70 ont d'abord mis en évidence une corrélation statistiquement significative entre exposition aux aflatoxines (mesurée par le biais d'échantillons de matières premières alimentaires et de « repas tels que consommés ») et taux d'incidence du cancer primaire du foie dérivés de registres hospitaliers dans différentes régions kenyanes (Peers and Linsell 1973; Peers and Linsell 1977; van Rensburg et al. 1990). Par la suite, des études analytiques ont été entreprises dans les pays particulièrement touchés par le cancer primaire du foie et susceptibles de présenter des niveaux de contamination des denrées alimentaires élevés, notamment la province chinoise du Guangxi (Yeh et al. 1989). Les études analytiques supposent de pouvoir estimer ou mesurer l'exposition au niveau individuel, ce qui, outre les problèmes classiquement rencontrés dans l'évaluation de la consommation alimentaire habituelle en épidémiologie nutritionnelle (Willett 1987) est rendu difficile dans le cas des aflatoxines et de nombreux contaminants alimentaires par les variations temporelles et géographiques des niveaux de contamination. Ainsi, l'exposition alimentaire survient généralement très tôt dans la vie d'un individu et se poursuit probablement la vie durant avec des fluctuations importantes d'une année à l'autre et d'un pays ou d'une région à l'autre en fonction des pratiques agricoles et de stockage des denrées, des variations climatiques saisonnières et annuelles, tant de facteurs difficiles à évaluer par le biais de questionnaires (Bosch and Peers 1991). Le développement de marqueurs biologiques d'exposition aux aflatoxines, en fournissant une mesure de l'exposition récente des sujets inclus dans des études prospectives (Groopman et al. 1996; Wang et al. 2001), a permis de quantifier le risque associé à l'exposition dans certaines populations et d'évaluer des actions de prévention, notamment en Chine (Kensler et al. 2002; Wild and Hall 2000).

Toutes ces approches épidémiologiques ont donc participé à l'identification comme à la caractérisation du danger que sont les aflatoxines en populations humaines. Le potentiel cancérigène initialement dérivé d'études animales a ainsi été abaissé de 200 (région endémique pour le VHB avec lequel les aflatoxines agissent en synergie) à 6000 fois (région non endémique) à partir des cohortes constituées à Shanghai et dans différentes provinces de Chine (WHO 1997)). L'évaluation épidémiologique des risques a permis de mettre en évidence l'importance du contexte dans lequel survenait l'exposition aux aflatoxines (synergie avec le virus de l'hépatite B en particulier). Tout en attestant de la cancérigénicité, les observations faites chez l'homme tendent d'une part à relativiser le risque de cancer primaire du foie attribuable aux aflatoxines dans différentes régions du monde en l'absence d'une infection par le VHB (Bosch et al. 2004) et d'autre part à identifier d'autres effets chroniques possibles de l'exposition alimentaire aux aflatoxines, tel le retard de croissance chez des enfants d'Afrique noire (Gong et al. 2002).

Sans rentrer cette fois dans le détail des données relatives au méthylmercure, nous notons par ailleurs que la disponibilité croissante des données épidémiologiques provenant des Îles Seychelles et Faroe est allée dans le sens d'un abaissement de la valeur toxique de référence (DHTP) de 3.3 à 1.6 µg/kg p.c./semaine afin de protéger le groupe de population le plus sensible vis-à-vis des effets neuro-développementaux : le fœtus (WHO 2004).

C'est donc forts de la certitude que les petits pas font les longs chemins et de l'enthousiasme du jardinier partant défricher son lopin de bon matin que nous avons construit durant ces trois ans (et des brouettes) une démarche de recherche autour de l'évaluation épidémiologique du risque lié à l'OTA. Un pas en avant, trois pas de travers... jamais en arrière ?

## V DES MOISSURES ET DES HOMMES

Nous fondant sur les recommandations du JECFA et sur les points soulevés plus haut (cf. III.3), nous avons mis en place un partenariat de recherche avec la Tunisie ainsi qu'une cotutelle de thèse avec l'AFSSA.

Pourquoi la Tunisie ? L'équipe tunisienne du Laboratoire de Recherche sur les Substances Biologiquement Compatibles (LRSBC de la Faculté de Médecine Dentaire de Monastir) s'est intéressée dès 1983 à l'implication de l'ochratoxine A dans la survenue d'une Néphropathie Interstitielle Chronique (NIC) d'étiologie indéterminée en Tunisie. Des niveaux de contamination anormalement élevés au regard de l'expérience européenne ont en effet été observés dans la diète de familles tunisiennes présentant des cas de NIC indéterminée (Maaroufi et al. 1995a), attestant la possibilité de forts niveaux d'exposition, au moins dans certains groupes de population. Ces niveaux de contamination pourraient s'expliquer par les conditions climatiques, les comportements de stockage des denrées et les habitudes alimentaires locales. Corrélativement, les niveaux d'imprégnation observés chez ces patients (OTA sérique) étaient parfois plus de 1000 fois supérieurs à ceux habituellement relevés en France et dans le reste de l'Europe occidentale.

Les travaux menés en clinique ont par ailleurs mis en évidence un ensemble de caractéristiques anatomo-pathologiques et biochimiques chez un certain nombre de patients atteints de NIC indéterminée, dont la caryomégalie des cellules rénales, l'élévation des niveaux de β2microglobuline dosée dans les urines et une sensibilité génétique familiale (Hassen et al. 2004). Des recherches toxicologiques ont également permis de reproduire chez le rat, par intoxication expérimentale à l'OTA, des lésions rénales telles que celles observées chez les patients atteints de NIC indéterminée (Maaroufi et al. 1999).

À la lumière de ce faisceau d'arguments ont donc été émises les hypothèses suivantes :

- Il existe dans la population tunisienne une entité nosologique à part entière, de type néphropathie interstitielle chronique, jamais décrite auparavant ;
- Cette affection est endémique dans certaines régions tunisiennes.

Par ailleurs :

- Il existe des niveaux contrastés d'exposition alimentaire à l'OTA dans la population tunisienne ;
- L'exposition alimentaire à de forts niveaux d'OTA est un facteur de risque de survenue de l'affection rénale décrite.

Manquait au tableau tunisien une dimension épidémiologique pour infirmer ou confirmer les hypothèses de recherche et formuler, si nécessaire, des recommandations en terme d'action de santé publique, auprès de la population tunisienne, et plus largement dans le cadre de la réglementation sanitaire internationale relative aux aliments destinés à la consommation humaine. C'est dans ce contexte que notre unité de recherche, et plus particulièrement par le biais de ce doctorat, a entrepris et élaboré un partenariat scientifique avec le laboratoire tunisien.

Un arbre de décision, présenté en Figure 6, a été mis au point conjointement afin d'organiser les étapes de la recherche à mettre en œuvre.

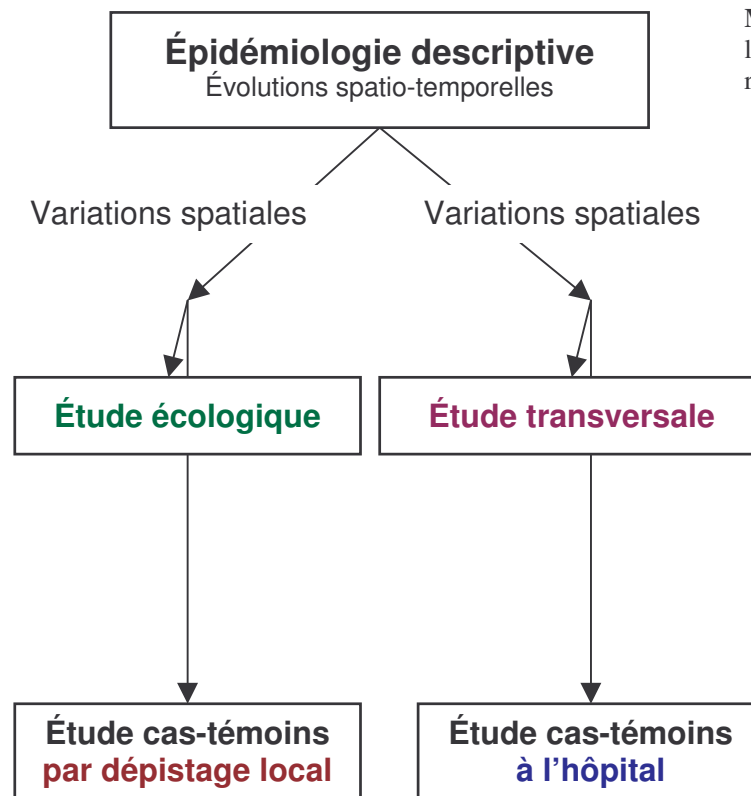
Nous avons par ailleurs évoqué au paragraphe III.2.3 les questions soulevées par la modélisation de l'exposition à l'OTA, notamment mais pas seulement dans la population française. La Direction de l'Évaluation des Risques Nutritionnels et Sanitaires de l'AFSSA est amenée à effectuer des évaluations d'exposition à différents contaminants chimiques des aliments qui appellent un travail méthodologique de « mise à plat » des modèles utilisés et de leurs hypothèses afin de pouvoir en interpréter les résultats en termes de dépassement des valeurs toxicologiques de référence. Nous avons en outre profité de ce travail méthodologique au niveau populationnel pour étendre notre réflexion à l'évaluation de l'exposition individuelle à l'OTA nécessaire dans les études transversales et analytiques, effectuant ainsi un chassé-croisé / aller-retour entre épidémiologie descriptive, méthodologie d'évaluation de l'exposition, et épidémiologie de terrain.

Nous présentons ici brièvement la démarche de chacun des trois volets de recherche développés. Nous demandons au lecteur de bien vouloir les considérer, à titre provisoire et par pure fantaisie dont vous n'aurez plus à pâtir par la suite, du moins pas avant longtemps, le serment en est ici fait, comme les trois actes non pas d'une farce mais d'un genre tout aussi ancien et, nous l'espérons, presque aussi respectable : la thèse.

**Objectif :** identifier les variations spatiales et temporelles d'incidence et de prévalence des NIC indéterminées, en particulier localiser des foyers endémiques dans lesquels des recherches spécifiques pourraient être menées.

**Objectif :** étudier les variations géographiques conjointes des niveaux d'exposition de la population et de l'incidence des NIC indéterminées au niveau national ou dans une sous-région particulièrement contrastée au regard de l'incidence.

**Méthode :** choix d'une zone d'étude (région ou pays entier); réalisation d'un plan d'échantillonnage représentatif pour évaluer l'exposition des groupes de population étudiés (contamination des denrées à l'OTA et à d'autres néphrotoxiques si présence d'activité industrielle particulière, imprégnation des matrices biologiques); modélisation des variations géographiques.



**Méthode :** constitution d'un fichier de données d'après le registre national des IRCT de Tunisie, ainsi que les recensements sur les 10 dernières années.

**Objectif :** caractériser l'exposition à l'OTA dans la population tunisienne; étudier le risque relatif de présenter une perturbation de la fonction rénale dans un groupe exposé par rapport à un groupe non exposé, et au sein du groupe exposé étudier une éventuelle relation dose-réponse.

**Méthode :** enquête dans un échantillon de personnes résidant dans une région où l'on suspecte de forts niveaux d'exposition à l'OTA et dans une région témoin: mesure de l'exposition (OTA dans le sang et les urines, OTA dans les aliments, mesures répétées) et de paramètres rénaux ( $\beta$ 2microglobuline urinaire, créatinurie, etc.).

**Objectif :** étudier le risque relatif d'exposition à l'OTA et d'autres néphrotoxiques chez des patients atteints de NIC indéterminée par rapport à des groupes témoins (patients atteints d'autres néphropathies, personnes en bonne santé issues de la population source des cas)

**Méthode :** organisation d'un dépistage systématique dans une zone repérée comme endémique pour recruter le nombre de cas et de témoins voulus.

**Méthode :** recrutement sur plusieurs années des cas incidents diagnostiqués dans les trois services de néphrologie de Monastir, Sfax et Tunis.

**Figure 6 :** Représentation schématique de l'arbre de décision applicable à la démarche de recherche en population tunisienne

## V.1 Acte premier : à la recherche du haricot magique

Dans ce travail descriptif, nous caractérisons et commentons l'incidence des affections rénales de type Insuffisance Rénale Chronique au stade Terminale et Traitée (IRCT) en Tunisie sur la période 1992-2001. Nous utilisons pour ce faire les données brutes du registre national communiquées par le Ministère Tunisien de la Santé Publique (cas incidents) et les données du recensement national obtenues auprès de l'Institut National de la Statistique.

Notre objectif principal est d'analyser les évolutions récentes dans la population tunisienne, notamment en termes de pathologie primaire, et de les comparer aux données internationales issues des registres européens.

Cette première étape dégage des tendances décennales originales en Tunisie et nous incite à nous prononcer en faveur d'une étude de type transversal (cf. figure 6). Elle fournit en outre des informations qualitatives quant au choix des régions d'enquête. Se pose alors doublement la question de l'évaluation de l'exposition.

## V.2 Acte deux : un champignon-modèle

Effectuant une "pause méthodologique" que l'on n'ose appeler "détour" tant les enseignements tirés nous tirent justement en avant, nous entamons alors un travail de modélisation de l'exposition prenant pour exemple l'Ochratoxine A en vue de déterminer la sensibilité des estimations de l'exposition vis-à-vis de la variabilité des données sources de consommation et de contamination. Nous distinguons deux niveaux d'analyse :

- la population : distributions à comparer aux valeurs toxicologiques de référence pour estimer la probabilité de leur dépassement (caractérisation du risque) ;
- l'individu : exposition d'un sujet inclus dans une étude étiologique afin de le classer correctement vis-à-vis des autres participants, ou d'estimer l'exposition quantitativement.

La modélisation porte sur la population française *via* l'utilisation des données de consommation de l'enquête INCA99 et de données nationales de surveillance de la contamination des denrées alimentaires, en étroite collaboration avec l'Observatoire des Consommations Alimentaires à l'AFSSA. Simulations de type Monte-Carlo et méthodes de réduction de la variance sont principalement mises en œuvre.

Les conclusions relatives à l'exposition de la population française sont rassurantes. Celles relatives à l'exposition individuelle incitent à utiliser des marqueurs biologiques d'exposition en complément des données alimentaires dans l'étude transversale tunisienne.

## V.3 Acte trois : partie de campagne

Nous avons enfin, tout au long de ces trois années, mis en place une étude épidémiologique de type transversal au sein de la population tunisienne, en partenariat avec le LRSBC et avec l'accord du Ministère de la Santé Publique tunisien.

Le protocole, baptisé OTARI (OTA, Tunisie, Alimentation, Rein, Investigation), a pour objectifs de quantifier les niveaux d'exposition individuelle à l'OTA de la population de trois régions tunisiennes et d'explorer l'existence d'une association entre l'exposition individuelle et la survenue d'effets toxiques rénaux à un stade infra-clinique.

L'OTA urinaire et sérique sont utilisés comme indicateurs d'exposition individuelle. Les atteintes rénales infra-cliniques sont évaluées à l'aide de marqueurs urinaires d'effets tubulo-

toxiques précoces. À partir des données de fréquence de consommation et de contamination d'aliments-types, un score d'exposition individuel à l'OTA est également calculé. Une étude pilote a été réalisée dans un premier temps afin de valider l'approche globale et les aspects logistiques.

La situation tunisienne soulève maintes questions.

## CHAPITRE 1:

# REGISTRE DES INSUFFISANCES RENALES CHRONIQUES TERMINALES TRAITEES EN TUNISIE

"Tout intérêt pour la maladie et la mort  
N'est autre qu'un intérêt pour la vie".

*La Montagne Magique*, Thomas Mann.

# LES AFFECTIONS RENALES EN POPULATION TUNISIENNE

<b>I</b>	<b>INTRODUCTION ET OBJECTIFS</b>	<b>26</b>
<b>I.1</b>	<b>Pathologies rénales possiblement reliées à l'OTA</b>	<b>26</b>
I.1.1	La néphropathie endémique des Balkans (NEB)	26
I.1.2	Les néphropathies interstitielles chroniques caryomégaliques (NIK)	29
<b>I.2</b>	<b>Description de l'entité nosologique</b>	<b>30</b>
I.2.1	Les néphropathies interstitielles chroniques idiopathiques (NICI)	30
I.2.2	Les néphropathies interstitielles caryomégaliques idiopathiques (NIKI)	32
I.2.3	Objectifs	33
<b>II</b>	<b>MATERIELS ET METHODES</b>	<b>34</b>
<b>II.1</b>	<b>Choix de l'affection-indicateur</b>	<b>34</b>
<b>II.2</b>	<b>Source des données</b>	<b>35</b>
II.2.1	Petite histoire du traitement de suppléance en Tunisie	36
II.2.2	Nature et qualité des données sanitaires	36
Accès au diagnostic		37
Diagnostic et Classification		37
Exhaustivité de l'enregistrement		39
Caractéristiques individuelles des patients		41
Période considérée		42
II.2.3	Données démographiques : recensement national	42
Correspondance entre les cas et la population de référence		42
Délimitation des grandes régions tunisiennes		42
<b>II.3</b>	<b>Estimation de l'incidence des IRCT</b>	<b>43</b>
II.3.1	Estimation de l'incidence	43
Taux bruts		43
Taux spécifiques		44
Taux standardisés		44
II.3.2	Calcul de l'intervalle de confiance	45
IC95% d'une proportion		45
IC95% d'un taux brut		46
IC95% d'un taux standardisé		46
<b>II.4</b>	<b>Traitements statistiques complémentaires</b>	<b>46</b>
<b>III</b>	<b>RESULTATS ET DISCUSSION</b>	<b>48</b>
<b>III.1</b>	<b>Incidence décennale (1992-2001)</b>	<b>48</b>
III.1.1	Incidence décennale globale	48
Taux spécifiques par âge		48
Taux spécifiques par sexe		49
III.1.2	Incidence décennale par pathologie primaire	49
Vue d'ensemble		49
Les pathologies primaires NIC et NICI		50
<b>III.2</b>	<b>Évolutions temporelles</b>	<b>52</b>
III.2.1	Âge des cas incidents	52
III.2.2	Incidence biannuelle par tranche d'âge et par sexe	53
III.2.3	Incidence biannuelle par pathologie primaire	55
Les pathologies primaires « courantes »		55
Les pathologies primaires NIC et NICI		57

<b>III.3</b>	<b>Variations spatiales</b>	<b>59</b>
III.3.1	Incidence globale par région	59
	Taux d'incidence régionaux décennaux	59
	Influence de l'âge et de l'accès aux soins	62
	Incidence biannuelle par région	65
III.3.2	Importance relative des pathologies primaires	66
	Incidence par région	66
	Proportion des cas de NIC et NICI	67
	Relation entre pathologie primaire, région et âge du patient	69
<b>IV</b>	<b>CONCLUSIONS</b>	<b>70</b>
IV.1.1	Une transition épidémiologique visible au niveau rénal	70
IV.1.2	La prédominance des causes indéterminées	71
IV.1.3	Des observations à relier à la problématique OTA	71
	Les faits	71
	Les opinions	72

## I INTRODUCTION ET OBJECTIFS

### I.1 Pathologies rénales possiblement reliées à l'OTA

La néphrotoxicité de l'OTA n'a pas été établie chez l'homme, très peu d'observations ayant été rapportées. La toxicité rénale aigüe est rare : un cas seulement a été décrit, dans des conditions exceptionnelles d'inhalation (Di Paolo et al. 1993).

D'après Godin et al. (1997), la toxicité rénale chronique est probable mais certainement mal identifiée au vu de son caractère tubulo-interstitiel et de son évolution à bas bruit, c'est-à-dire du fait que cette pathologie est longtemps asymptomatique, sans œdème ni hypertension artérielle notamment. Deux catégories d'atteintes rénales de type néphropathies (tubulo)interstitielles chroniques ont été associées à l'exposition à l'OTA dans la littérature néphrologique : la Néphropathie Endémique des Balkans (NEB) et la Néphropathie Interstitielle Chronique Caryomégalique (NIK). Nous en décrivons ici les principales caractéristiques cliniques, biologiques, histo-pathologiques et, le cas échéant, étiologiques.

#### I.1.1 La néphropathie endémique des Balkans (NEB)

L'OTA a été isolée d'une culture microbienne pour la première fois en 1965 (van der Merwe et al. 1965), mais ce n'est que dans les années 70 que son implication dans la survenue de pathologies rénales chez l'animal et l'homme a été envisagée.

En effet, c'est à cette époque que plusieurs études d'observation et expérimentales ont permis d'établir la causalité de la relation entre une néphropathie porcine, endémique au Danemark et dans d'autres pays d'Europe, et la consommation d'aliments contaminés à l'OTA (Elling and Moller 1973; Hald 1991; Krogh et al. 1973; Stoev et al. 1998).

Parallèlement à ces investigations chez le porc, une néphropathie tubulo-interstitielle chronique sévissait de manière endémique dans certaines régions des Balkans, ce au moins depuis le milieu des années 50, période à laquelle elle a été découverte et décrite, probablement en raison de l'amélioration de l'accès aux soins des populations (Tanchev and Dorossiev 1991). La figure 1 présente la localisation géographique des foyers endémiques où la prévalence est comprise entre 2 et 10%, sous-estimée en raison du caractère largement asymptomatique de la progression de l'affection (Stefanovic and Polenakovic 1991). Seules les populations rurales de la péninsule balkanique, en particulier les régions de Bosnie Herzégovine, Bulgarie, Croatie, Roumanie et Yougoslavie (Serbie) situées dans le bassin du Danube, sont affectées. Cette néphropathie idiopathique, incurable et rapidement fatale après la manifestation des premiers symptômes (mortalité spécifique pour la période 1957-1984 supérieure à 3‰, Ceovic et al. 1992) est devenue une préoccupation majeure de santé publique dans cette région du monde, ainsi qu'une énigme pour la communauté des néphrologues. En 1964, un groupe d'experts internationaux réunis par l'Organisation Mondiale de la Santé décrit l'affection (World Health Organization 1965), qui est reconnue comme entité nosologique à part entière sous l'appellation : « Néphropathie Endémique des Balkans » (NEB) et inscrite dans le système international de classification des maladies en 1989 (ICD10).

Brièvement, sur un plan clinique, la maladie se déclare en général entre l'âge de 50 et 60 ans et progresse très lentement vers une insuffisance rénale terminale. Après le développement de signes et symptômes non spécifiques, tels qu'une anémie marquée et une protéinurie modérée sans hypertension artérielle, des atteintes rénales de nature non-inflammatoire apparaissent, en particulier la nécrose tubulaire, la hyalinisation des glomérules et, dans les stades les plus

avancés, la fibrose interstitielle. Ces atteintes sont similaires à celles rencontrées chez le porc, à ceci près qu'on observe une atrophie des reins dans le cas de la NEB et une hypertrophie dans le cas de la néphropathie porcine (Radonic and Radosevic 1992).

Une augmentation de l'excrétion urinaire de  $\beta$ 2microglobuline pourrait constituer un indicateur précoce sensible de progression de la NEB (Hrabar et al. 1991; Jevremovic et al. 1991; Radonic 1978).



**Figure 1** : Zones endémiques pour la NEB.  
D'après (Stefanovic and Polenakovic 1991)

Sur le plan épidémiologique, on constate une agrégation familiale des cas et la nécessité d'avoir vécu 10 ans au moins dans un village dit « endémique » pour développer l'affection. Seules les personnes exerçant une activité agricole sont à risque. Les enfants ne sont pas touchés et les femmes plus souvent que les hommes (ratio homme:femme de 3:2 environ). Les villages endémiques et non endémiques sont parfois situés à seulement quelques kilomètres les uns des autres, et au sein d'un même voisinage cohabitent des familles affectées et d'autre indemnes.

Aucun facteur étiologique n'a pu être mis clairement en évidence (Plestina 1992), en dépit d'hypothèses variées passées en revue par Pfohl-Leszko et al. (2002) : métaux lourds et autres éléments métalliques et minéraux dans l'eau de boisson et le sol, impliquant en particulier une carence en sélénium ; infection bactérienne à *E.Coli*, leptospirose et particules virales possiblement transmises par des rongeurs ; acide aristolochique, un alcaloïde présent dans la pharmacopée chinoise et retrouvé dans le blé, impliqué dans la néphropathie aux herbes chinoises ; toxines microbiennes dans les aliments, dont l'OTA, la citrinine et d'autres toxines produites par des moisissures du genre *Penicillium* ; enfin et plus récemment, hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et amines aromatiques dans l'eau de boisson provenant de lignites du Pliocène (Tatu et al. 1998).

La nature principalement environnementale de l'étiologie a été démontrée par une étude de migrants (Ceovic et al. 1985) : deux populations génétiquement distinctes, l'une originaire de Yougoslavie, l'autre immigrante de l'Ukraine, toutes deux installées dans des régions endémiques de la Yougoslavie, présentaient des prévalences similaires de NEB. Toutefois, l'agrégation familiale des cas continue de soulever la question de l'implication de prédispositions génétiques (Toncheva and Dimitrov 1996; Toncheva et al. 1998; Toncheva et al. 1988).

Différents arguments militent depuis longtemps en faveur de l'implication de l'OTA dans la survenue de la NEB :

- La plus grande fréquence de contamination des aliments par l'OTA dans les régions endémiques, dont les populations rurales pratiquent l'auto-consommation et le stockage des aliments de base (Krogh et al. 1977; Pavlovic et al. 1979; Petkova-Bocharova and Castegnaro 1985; Puntaric et al. 2001; Vrabcheva et al. 2004; Vrabcheva et al. 2000) ; de même, la forte prévalence des prélèvements sanguins contaminés chez les habitants de ces régions endémiques (Fuchs et al. 1991; Nikolov et al. 1996; Petkova-Bocharova and Castegnaro 1991; Petkova-Bocharova et al. 1988; Plestina et al. 1990; Radic et al. 1997) ;
- La variabilité saisonnière et annuelle des niveaux de contamination des aliments par l'OTA, variabilité constatée également dans la protéinurie, la prévalence et l'incidence de la NEB, ainsi que la corrélation positive entre l'excès de précipitations et le nombre de personnes décédées des suites d'une NEB dans les deux années consécutives (Austwick et al. 1979; Plestina 1992) ;
- L'agrégation familiale, compatible avec un facteur de risque alimentaire partagé par les différents membres de la famille (habitudes d'approvisionnement, de stockage et fréquence de consommation) ;
- L'association fréquente de tumeurs du tractus urinaire (urètre, pelvis rénal et plus récemment vessie) à cette néphropathie, évoquant des facteurs de risque à la fois néphrotoxiques et cancérigènes (Chernozemsky et al. 1978; Cvorisec et al. 1998; Djokic et al. 1999; Radovanovic et al. 1991; Stewart et al. 2003; Stojanov et al. 1977; Stoyanov et al. 1978) ;
- Une certaine reproductibilité expérimentale des effets néphrotoxiques et cancérigènes de l'OTA suspectés chez l'homme, en particulier chez le rat, la souris, le poulet et le porc (Krogh 1992; Krogh et al. 1979; Krogh et al. 1976; Stoev et al. 2004).

Il existe toutefois des éléments contradictoires, tels que l'observation sur une période de 5 ans en Croatie de fréquences et niveaux de contamination des sérums par l'OTA aussi élevés dans les villages non endémiques que dans leurs voisins endémiques, voire supérieurs pour l'année 1985 (Fuchs et al. 1991), résultats confirmés par Radic et al. (1997). Plus récemment, la détermination de l'OTA dans la diète de ménages issus de villages endémiques ou non en Bulgarie a remis en cause l'implication de la seule OTA dans la survenue des cas de NEB observés (Abouzied et al. 2002), bien que le délai entre exposition et survenue de la pathologie rénale puisse invalider ce genre de raisonnement « simultané » (comparer simultanément l'exposition à l'OTA et le caractère endémique d'un village pour la NEB).

De plus, la présence concomitante de citrinine (une autre mycotoxine) dans les denrées consommées par les familles affectées par la NEB (Vrabcheva et al. 2000) et la mise en évidence d'autres toxines produites par des moisissures du genre *Penicillium* dont le potentiel néphrotoxique serait supérieur à celui de l'OTA (Mantle et al. 1991b) interrogent l'importance respective de ces différentes toxines dans la pathogenèse rénale. Arlt et al. (2002) et Hranjec et al. (2005) évoquent également la possibilité que l'acide aristolochique, néphrotoxique et cancérigène comme l'OTA, puisse concourir à la survenue des tumeurs du

tractus urinaire associées à la NEB dans les zones endémiques.

Dans le même ordre d'idée, l'hypothèse d'une action synergique de plusieurs toxines environnementales, dont l'OTA et la citrinine, conjuguée à l'existence de prédispositions génétiques encore non identifiées, a été récemment avancée dans le cas de la néphropathie porcine observée en Bulgarie (Stoev, Hald et al. 1998), comme suggéré auparavant par Berndt et al. (1980) et Hald (1991).

L'ensemble des études relatives à l'étiologie de la NEB, longtemps rendues difficiles par le contexte social puis politique des Balkans et l'absence d'études prospectives sur les facteurs de risques identifiés, laisse aujourd'hui à penser que cette pathologie est vraisemblablement d'origine pluri-factorielle.

Si tant est que l'OTA soit réellement un facteur de risque pour la NEB et les tumeurs du tractus urinaire associées, la mycotoxine agirait donc très probablement en synergie avec d'autres toxines (la citrinine, en particulier, et possiblement l'acide aristolochique), des éléments en trace (possiblement une carence en sélénium) ainsi que des composés organiques (contamination de l'eau par ruissellement à travers les lignites du Pliocène).

En outre, il n'est pas possible à ce jour de déterminer si l'OTA interviendrait dans la phase d'initiation de la NEB, ou dans celle de progression vers une insuffisance rénale, tel que suggéré par Hsieh et al. (2004), en particulier concernant la néphropathie diabétique.

#### 1.1.2 Les néphropathies interstitielles chroniques caryomégaliennes (NIK)

La deuxième affection décrite plus récemment dans la littérature comme possiblement liée à une exposition chronique à l'OTA est une néphropathie interstitielle caryomégalique idiopathique (NIK).

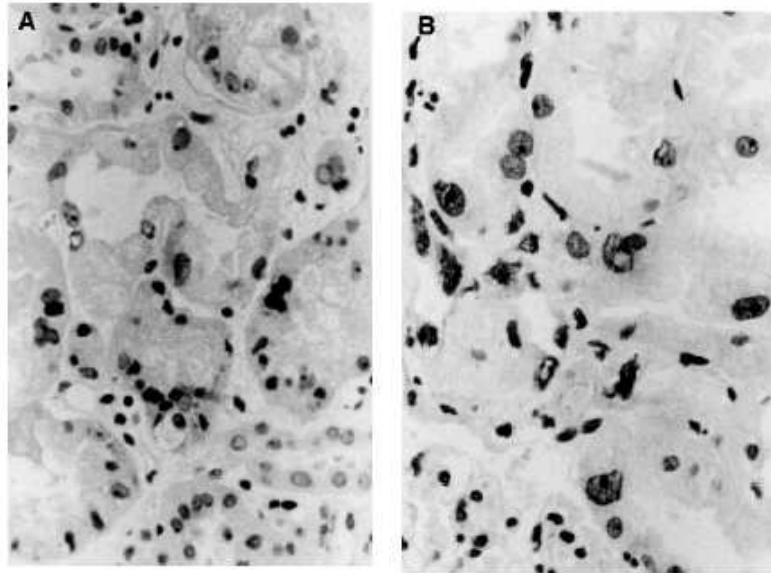
L'équipe de Godin et al. (1997) a rapporté deux cas cliniques d'insuffisance rénale chronique avec atrophie tubulaire, fibrose interstitielle et la présence de gros noyaux hyper-chromatiques dans les cellules épithéliales des tubules proximaux et distaux et les cellules endothéliales des capillaires péri-tubulaires. La figure 2 illustre le type de lésions typiquement observées au niveau du néphron. Corrélativement, les teneurs en OTA dans le sérum (20.5 et 367 ng/ml) et les urines (1001 et 1810 ng/ml) étaient extrêmement élevées. Ces deux cas s'apparentaient à une entité nosologique rare, ou du moins rarement rapportée, identifiée pour la première fois par Burry (1974) puis décrite par Mihatsch et al. (1979) à partir de trois cas : la néphropathie interstitielle avec caryomégalie (NIK). En Tunisie, trois cas familiaux de NIK ont été décrits par Hassen et al. (2004), associés à des teneurs sériques (505.8, 102.6 et 1023.0 ng/ml) et urinaires (94.4 et 10.2 ng/ml) en OTA extrêmement élevés.

Plusieurs cas de NIK ont également été rapportés sans qu'une association avec l'OTA ne soit probable ou recherchée : six en Australie (Bhandari et al. 2002), cinq en Suisse (Moch et al. 1994; Spöndlin et al. 1995) et un en Grèce (Vadiaka et al. 1998).

Aucune étiologie tubulo-interstitielle habituelle - consommation d'analgésiques, exposition aux métaux lourds ou aux herbes chinoises, autres causes - n'a pu être associée à ces cas, cependant que l'hypothèse d'une sensibilité génétique liée au système HLA, possiblement les types A9 et B35, est évoquée. La conjonction de l'exposition à un xénobiotique et d'une sensibilité génétique familiale est avancée par différents auteurs, en particulier Bhandari et al. (2002).

La NIK n'est reconnue à ce jour comme entité nosologique à part entière ni dans le système de classification international des maladies, ni dans la classification de l'European Renal Association - European Dialysis and Transplantation Association (ERA-EDTA), organe de coordination européenne des registres nationaux de la prise en charge de l'insuffisance rénale.

Ceci rend impossible l'étude directe de sa fréquence et de sa distribution. Bhandari et al. (2002) postulent que cette affection est probablement sous-identifiée du fait de la nécessité de pratiquer une biopsie rénale pour en établir le diagnostic de type histologique. La biopsie rénale est d'autant plus rarement pratiquée que le stade de dépistage de l'insuffisance rénale associée est avancé. En effet, le risque de complications augmente pour le patient présentant des reins atrophiés et l'interprétation des observations histologiques est difficile en présence de fibrose interstitielle et de nécrose tubulaire avancées.



**Figure 2** : Tubules corticaux de deux cas présentant des cellules épithéliales à gros noyaux polychromatiques (x420). Reproduit de (Bhandari et al. 2002).

La plupart des cas de NIK doivent donc se retrouver par défaut dans la catégorie des diagnostics interstitiels idiopathiques (NICI), si ce n'est dans celle des néphropathies de cause incertaine ou indéterminée.

C'est ce type de néphropathie, que nous assimilerons à la catégorie des NICI, qui a été identifié en Tunisie comme possiblement lié à l'exposition à l'OTA, et dont nous décrivons les principales caractéristiques.

## 1.2 Description de l'entité nosologique

### 1.2.1 Les néphropathies interstitielles chroniques idiopathiques (NICI)

Dès le début des années 1990, Achour and al. (1993) relèvent une fréquence élevée de néphropathies interstitielles (NIC) en Tunisie (20 à 30% des cas dépistés) dont 30% de cause indéterminée (NICI). Sur la base des ressemblances cliniques avec la NEB décrite plus haut et de la présence d'OTA dans les aliments de consommation courante en Tunisie, l'hypothèse de l'implication de l'exposition chronique à l'OTA par voie alimentaire dans la survenue de ce type de pathologie en population tunisienne est formulée (Maaroufi et al. 1995a; Maaroufi et al. 1995b). En effet, la néphropathie interstitielle décrite est chronique, bilatérale, non inflammatoire, primitivement tubulo-interstitielle, asymptomatique jusqu'à l'âge de 40 à 50 ans, et évoluant à bas bruit jusqu'à l'insuffisance rénale. Abid et al. (2003) font un point de quatre études menées par l'équipe de Bacha et coll. entre 1991 et 2000 dans lesquelles les teneurs sériques et parfois alimentaires d'OTA, ainsi que la  $\beta$ 2microglobuline urinaire ont été

déterminées dans plusieurs groupes de population, le plus souvent recrutés dans la région de Monastir (Centre-Est du pays) : témoins en bonne santé, patients atteints de NIC, de NIC idiopathique (NICI), ou d'autres types de néphropathies chroniques (NAutres). L'ensemble des résultats obtenus et résumés au tableau 1 indiquent :

- D'une part une élévation importante et significative de l'OTA sérique chez les personnes atteintes de NIC (1991) et de NICI (1994 et 1997) par rapport à celles atteintes d'un autre type de néphropathie chronique et elles-mêmes relativement aux contrôles ;
- D'autre part, une élévation significative de l'OTA sérique chez les personnes atteintes de NICI par rapport aux NIC (2000), s'accompagnant d'une élévation non significative de la  $\beta$ 2microglobuline urinaire entre les deux groupes, et d'une contamination alimentaire significativement plus élevée chez les patients atteints de NICI que chez les témoins.

Année (effectif)	Témoins	NIC	NAutres	NICI
<b>1991</b>	25	Total NIC & Autres : 244		-
%>LOD	82	95	87	-
$\mu \pm$ E.T.	3.35 $\pm$ 2.32	52.70 $\pm$ 22.58	6.75 $\pm$ 2.79	-
étendue	1.20-5.50	12.30-62.80	0.00-8.30	-
<b>1994</b>	140	-	Total Autres & NICI : 610	
%>LOD	77	-	96	100
$\mu \pm$ E.T.	2.25 $\pm$ 2.00	-	12.60 $\pm$ 6.36	55.60 $\pm$ 19.00
étendue	1.70-2.80	-	9.00-18.00	23.00-62.00
<b>1997</b>	20	-	40	20
%>LOD	71	-	83	93
$\mu \pm$ E.T. (OTA <sub>s</sub> )	2.60 $\pm$ 2.30	-	8.11 $\pm$ 6.00	44.40 $\pm$ 19.00
$\mu \pm$ E.T. ( $\beta$ 2M <sub>U</sub> )	0.09 $\pm$ 0.02	-	0.71 $\pm$ 0.06	2.35 $\pm$ 0.45
<b>2000</b>	20	20	-	20
%>LOD	62	78	-	100
$\mu \pm$ E.T. (OTA <sub>s</sub> )	1.22 $\pm$ 1.20	12.36 $\pm$ 4.40	-	50.40 $\pm$ 8.20
$\mu \pm$ E.T. ( $\beta$ 2M <sub>U</sub> )	0.12 $\pm$ 0.07	1.45 $\pm$ 0.91	-	1.96 $\pm$ 0.99

**Tableau 1** : Étude de l'association entre OTA sérique (OTA<sub>s</sub>) et type de néphropathie en Tunisie. Adapté de (Abid et al. 2003).  
 LOD : Limite Of Detection ;  $\beta$ 2M<sub>U</sub> :  $\beta$ 2-microglobuline urinaire.  
 $\mu$  : moyenne; E.T.: écart-type.

Ce type de comparaison est toutefois à prendre avec réserve, dans la mesure où, même si en 1997 et 2000, les patients ont été recrutés sur la base d'une créatinine sérique de 200 à 300  $\mu$ M, ce paramètre reflète l'état de la filtration glomérulaire, et ne donne pas d'indication sur la fonction de sécrétion tubulaire. À des stades « précoces » où la fonction glomérulaire est modérément quoique significativement affectée (créatininémie de 200 à 300  $\mu$ M), il est possible d'observer une diminution du pouvoir de concentration et du flux plasmatique rénal (diminution de la clairance de l'acide para-amino-hippurique, un anion organique, et élévation de la fraction de filtration) chez des patients atteints de néphropathie interstitielle. Or, l'OTA étant très largement liée à des protéines plasmatiques de type sérumbumine, la sécrétion tubulaire semble être sa principale voie d'excrétion rénale, laquelle est probablement d'autant plus altérée que la fibrose interstitielle et les lésions tubulaires sont présentes à des stades avancés. Il existe peu de données cliniques relatives à l'influence des pathologies rénales chroniques dont l'IRC à différents stades sur l'excrétion et en particulier la sécrétion rénale des anions et cations organiques (xénobiotiques divers dont l'ochratoxine A, médicaments et produits de leur métabolisme, molécules endogènes). Dans une revue des données

pharmacocinétiques disponibles, Dorne et al. (2004) indiquent cependant que la clairance rénale de 18 substances excrétées par le rein est divisée par un facteur 2 à 23 chez les personnes atteintes d'une maladie rénale chronique.

### 1.2.2 Les néphropathies interstitielles caryomégaliennes idiopathiques (NIKI)

Précisant la nature de l'affection interstitielle possiblement reliée à une exposition chronique à l'OTA, Hassen et al. (2004) ont signalé l'existence de rares cas de NIKI en Tunisie. Se fondant sur la description de 3 cas évoqués plus haut, présentant des niveaux sériques et urinaires exceptionnellement élevés d'OTA, les auteurs postulent qu'une exposition alimentaire chronique à l'OTA, possiblement associée à la présence des types HLA B27/35, pourrait être à l'origine d'un nombre indéterminé de cas de NIKI présentant une agrégation familiale dans la population tunisienne. Ces cas de NIKI seraient la plupart du temps diagnostiqués par défaut comme NICI, concourant à la fréquence de survenue de cette affection décrite dans la région Centre notamment (Kaiss 1999).

Ces observations chez l'homme sont appuyées par la reproduction expérimentale chez le rat, *via* l'exposition à l'OTA, de lésions tubulaires et interstitielles avec anomalies cellulaires de type caryomégalie (Baudrimont et al. 2001; Boorman et al. 1992; Maaroufi et al. 1999; Munro et al. 1974), bien que d'autres toxines produites par des champignons du genre *Penicillium* semblent pouvoir concurrencer l'implication de l'OTA (Mantle et al. 1991a), comme évoqué plus haut pour la NEB.

Le mécanisme par lequel l'exposition chronique à l'OTA serait reliée à la karyomégalie des cellules épithéliales tubulaires demeure inconnu. En revanche, O'Brien and Dietrich (2005) proposent une hypothèse mécanistique d'induction de la fibrose interstitielle observée chez le porc et caractéristique de la NEB et de la NIC : l'OTA exercerait un effet cytotoxique/cytostatique sur les cellules épithéliales rénales du tubule proximal, couplé à une prolifération continue des fibroblastes remplaçant progressivement les tissus fonctionnels. En effet, la mort cellulaire au niveau de l'épithélium tubulaire conduirait au recrutement des macrophages et d'autres cellules du système immunitaire ainsi qu'à la libération de cytokines susceptibles de favoriser la prolifération des fibroblastes, relativement insensibles à l'OTA (Sauvant et al. 2005).

Quant à l'origine des effets cytotoxiques de l'OTA sur les cellules tubulaires, il n'existe pas de consensus. Il est probable que l'OTA s'y accumule, notamment par le biais de transporteurs d'anions organiques (Babu et al. 2002; Jung et al. 2001). Restent à déterminer la nature et la gravité (y compris la réversibilité) des effets qui sont susceptibles de varier en fonction de la dose, de l'espèce, de l'âge et du sexe. Gekle et al. (1998) rappellent que la plupart des études de toxicité expérimentale ont été réalisées à fortes doses (concentrations micro-molaires) pour lesquels les effets de l'OTA sont aspécifiques : inhibition de la synthèse de macromolécules, peroxydation lipidique et blocage de la respiration mitochondriale. Ils proposent en outre à faibles doses (concentrations nano-molaires) des effets spécifiques conduisant à des modifications la fonction et/ou du phénotype des cellules du tubule proximal et du tube collecteur *via* la perturbation des signaux et régulations cellulaires (Gekle et al. 2005). L'intégrité cellulaire ne serait pas nécessairement altérée, mais des modifications de la fonction rénale et possiblement de l'homéostasie générale pourraient, à terme, survenir.

### 1.2.3 Objectifs

L'incidence des NIC, et plus particulièrement des NICI n'a, à notre connaissance et à ce jour, pas été étudiée extensivement dans la population tunisienne. Un doctorat de médecine s'est toutefois intéressé à cette affection dans la région Centre (Kaiss 1999). Ainsi, entre 1992 et 1998, 110 nouveaux cas de NIC ont été diagnostiqués, soit 21% des patients recrutés dans le service de néphrologie concerné, dont 34% de NIC idiopathiques.

Il ne nous est pas possible d'étendre l'étude directe de la fréquence et de la distribution des NIC dans la population tunisienne, d'une part parce qu'elles sont rarement dépistées à des stades précoces, et d'autre part car elles ne sont pas enregistrées de manière systématique à travers le pays. Il existe cependant une source d'information exhaustive en matière de pathologie rénale : le registre national des insuffisances rénales chroniques terminales traitées.

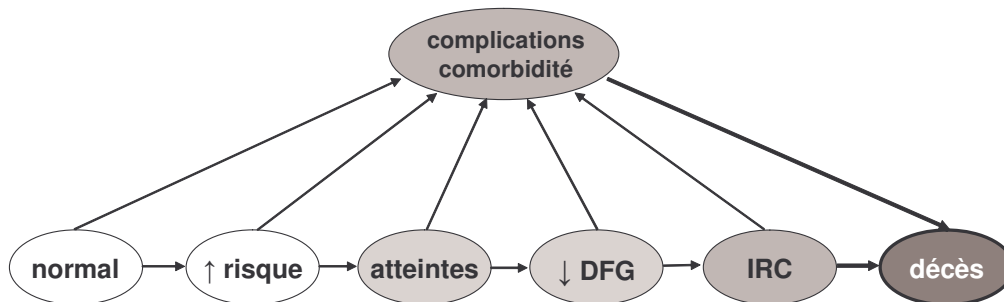
L'insuffisance rénale est définie comme l'altération de la fonction excrétrice des reins, appelée usuellement fonction rénale et mesurée par la diminution du débit de filtration glomérulaire (DFG). Cette altération concerne aussi les autres fonctions des reins. L'insuffisance rénale chronique (IRC) est souvent évolutive et s'aggrave progressivement. Lorsque l'insuffisance rénale est majeure ou terminale (IRCT), la prolongation de la vie n'est possible que grâce aux traitements de suppléance que sont l'épuration extra-rénale (EER, ou hémodialyse), la dialyse péritonéale, et la transplantation rénale. Par suite, nous appelons IRCT l'insuffisance rénale terminale traitée. L'EER consiste à purifier le sang de manière « extra-corporelle », c'est-à-dire à retirer à l'aide d'un filtre les produits non-volatiles du métabolisme, les électrolytes et les fluides qui se retrouvent en excès dans la circulation générale ; la dialyse péritonéale se fait par filtration à travers le péritoine (Mallick and Gokal 1999).

Nous adoptons dans un premier temps une approche descriptive avec pour objectifs de caractériser la force d'incidence des insuffisances rénales terminales dans la population tunisienne, par type de pathologie primaire au cours du temps (dernière décennie) et à travers l'espace (entre régions). Cette démarche devrait nous permettre d'apprécier les évolutions récentes dans la fréquence de survenue des IRCT et d'identifier d'éventuelles variations géographiques à mettre en relation avec des facteurs environnementaux, comme cela a pu être le cas avec l'exposition au Cadmium dans la population suédoise, notamment (Hellstrom et al. 2001).

## II MATÉRIELS ET MÉTHODES

### II.1 Choix de l'affection-indicateur

La figure 3 illustre le modèle adopté par la National Kidney Foundation nord-américaine concernant l'évolution des pathologies rénales chroniques (« atteintes » et « ↓ DFG ») vers l'IRC (des stades précoces au stade terminal) et le décès survenant soit directement des suites de l'IRC terminale, soit de complications et d'états morbides liés à la pathologie rénale.

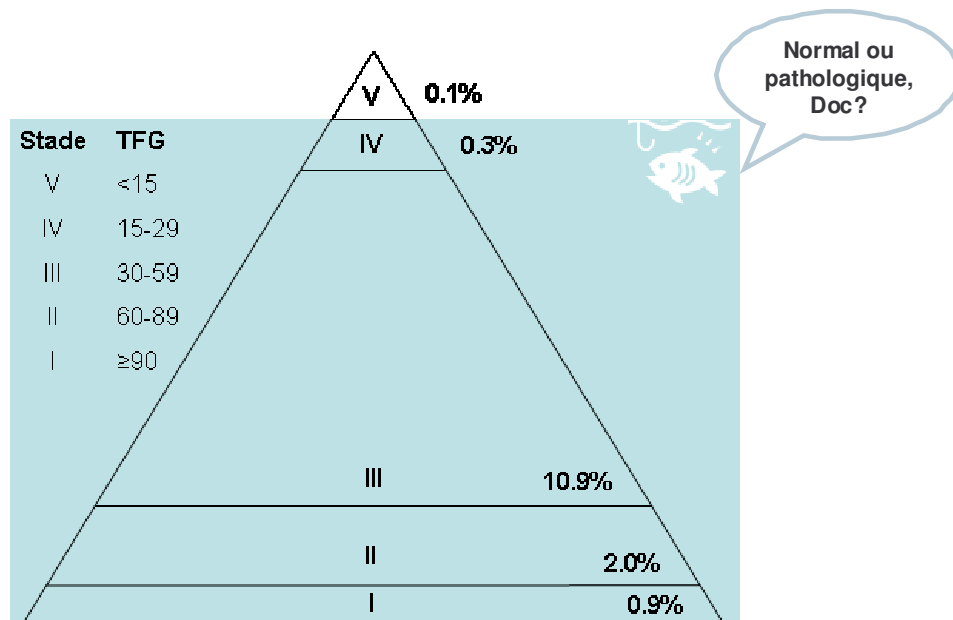


**Figure 3** : Le continuum des pathologies rénales chroniques : du « normal » au « pathologique » *via* l'initiation (I) et la progression (P). DFG : débit de filtration glomérulaire. Adapté de (K/DOQI 2002).

Les patients bénéficiant d'un traitement de suppléance de l'insuffisance rénale terminale (EER ou greffe) ne représentent que la partie émergée de l'« iceberg » des personnes atteintes d'une pathologie rénale chronique (White et al. 2005). Il est bien entendu que l'incidence de l'insuffisance rénale chronique traitée (IRCT) est inférieure à celle de l'IRC tous stades confondus et *a fortiori* des pathologies rénales chroniques évoluant à bas bruit sans IRC, comme illustré par la figure 4.

Il est important de noter qu'à chaque stade de la pathologie rénale initiale, la probabilité de décès est largement plus élevée que celle de progression vers l'IRC (Keith et al. 2004), pointant la faible proportion des cas présentant des atteintes rénales et arrivant effectivement au stade terminal et traité de l'IRC. Parmar (2002) estime ainsi que dans la population états-unienne, pour chaque personne prise en charge par EER ou transplantation rénale, 20 à 30 de personnes présenteraient une altération de la fonction rénale à des stades divers.

Dans la région Centre de la Tunisie, une étude a dénombré pour l'année 1998 un total de 300 nouveaux cas d'IRC, dont 221 (73.7%) pris en charge par voie médicamenteuse (traitement conservateur des patients atteints d'IRC modérée), 76 (25.3%) traités par épuration extrarénale (EER), la plupart du temps par hémodialyse, et seulement 3 (1%) ayant bénéficié d'une greffe préemptive avant traitement par dialyse (Sabra 2001).



**Figure 4 :** L'« iceberg » des maladies rénales chroniques dans la population générale.

Les pourcentages en fonction du stade de l'IRC, défini par le Taux (Débit) de Filtration Glomérulaire (TFG ou DFG, ml/min/1.73m<sup>2</sup>) selon les recommandations internationales (K/DOQI 2002), se rapportent aux populations Australienne et Néo-Zélandaise. Adapté de (White et al. 2005).

La prise en charge de l'IRC terminale étant coûteuse et nécessitant une planification sanitaire annuelle des besoins en équipements et capacités d'accueil, un registre médico-administratif existe dans de nombreux pays, y compris en Tunisie. Ce registre constitue notre principale source de données sur l'incidence des pathologies rénales dans la population tunisienne.

## II.2 Source des données

Le calcul de la fréquence d'une maladie dans une population implique la définition d'un numérateur (ex : nombre de nouveaux cas enregistrés pendant la période T) et d'un dénominateur (population soumise au risque de développer cette maladie pendant la période T). Les statistiques populationnelles actuellement disponibles en Tunisie et permettant d'approcher l'incidence des NIC et NICI *via* celle des IRCT sont :

- d'une part le registre national des Insuffisances Rénales Chroniques Traitées (Ministère de la Santé Publique) pour le dénombrement des cas d'IRCT par pathologie primaire ;
- d'autre part les données du recensement national (Institut National de la Statistique) pour la définition de la population de référence.

Les informations médicales collectées à d'autres fins que la recherche épidémiologique ne peuvent cependant être utilisées que si une évaluation rigoureuse des limites de leur qualité est effectuée. En effet, la validité des calculs de fréquence de la maladie étudiée peut être compromise par un dénombrement des cas erroné et par une mauvaise correspondance entre les cas et la population de référence. Nous présentons ici les éléments d'information relatifs aux données sanitaires que nous avons pu collecter auprès de médecins néphrologues du service de néphrologie du CHU de Monastir ainsi des deux personnes en charge de la tenue du registre national des IRCT au Ministère de la Santé Publique. Et décrivons les données démographiques obtenues auprès de l'Institut National de la Statistique (INS).

### II.2.1 Petite histoire du traitement de suppléance en Tunisie

La prise en charge de l'insuffisance rénale par dialyse a commencé en 1968 en Tunisie par le biais de structures exclusivement publiques, la première ayant été instituée au service de néphrologie de l'hôpital Charles Nicolle de Tunis. À partir de 1976, des centres de dialyse privés se voient attribuer des dérogations par la caisse de sécurité sociale pour la prise en charge par hémodialyse des patients atteints d'IRC. Dès lors, le secteur privé se développe sur la base de l'examen des demandes de création de centre, d'acquisition de postes de dialyse et de suivi de nouveaux patients formulées par chaque centre. Les autorisations sont délivrées par une commission nationale indépendante de néphrologues jusqu'en 1989, date à laquelle la commission est intégrée à l'administration centrale (Ministère de la Santé Publique, Direction de la Réglementation et du Contrôle des Etablissements Sanitaires). La même année, un nouveau texte de loi relatif à la planification sanitaire de la prise en charge des IRC par dialyse est adopté. Tous les centres agréés doivent remplir un rapport semestriel d'activité médicale conditionnant le déblocage de leurs crédits de fonctionnement. Ce rapport comprend une partie détaillant le personnel et l'activité du centre permettant l'identification des besoins en terme de carte sanitaire ainsi qu'un état nominatif des malades traités au cours du semestre. Le taux de réponse des 122 centres avoisine les 100% en 2003 et l'information est centralisée par une seule personne chargée de vérifier la qualité des données transmises par les centres et de les contacter le cas échéant pour compléter les données manquantes (ceci ne prémunit pas contre la sous-déclaration du nombre de patients par oubli, sous-déclaration toutefois fort peu probable dans la mesure où le centre reçoit ses dotations sur la base du nombre de patients pris en charge ou encore de séances d'hémodialyse. La vigilance est donc très probablement de mise). La prise en charge des patients atteints d'IRC n'a depuis cessé de progresser sur le plan quantitatif aussi bien que de la qualité de vie, notamment en termes de distance entre l'habitation et le centre de dialyse et de durée et fréquence des séances. Enfin, on peut noter une volonté d'augmenter la capacité d'accueil des centres publics en particulier en matière de prise en charge des personnes relevant de la caisse des indigents. Ainsi, les autorisations ont été gelées pour le secteur privé depuis trois ans à la faveur de l'ouverture de nouveaux centres publics dans les hôpitaux régionaux, l'objectif étant d'atteindre une unité d'hémodialyse par siège de gouvernorat d'ici à la fin 2003 en plus des quatre unités hospitalo-universitaires. Un autre problème auquel doivent faire face ces quatre unités de CHU est qu'elles étaient jusqu'à récemment les seules à pouvoir établir le diagnostic d'IRC nécessitant la prescription d'une EER. Les consultations externes et les services de néphrologies s'en trouvent surchargés. La tendance est à la mise en place de consultations de néphrologie dans les hôpitaux régionaux permettant de prescrire directement le traitement par EER en dehors des CHU.

L'activité des centres privés est par ailleurs plafonnée en terme de nombre de machines d'hémodialyse, de séances et de patients reçus par semaine, ce qui n'est pas le cas dans le secteur public où l'activité s'ajuste en principe en fonction du nombre de malades diagnostiqués.

### II.2.2 Nature et qualité des données sanitaires

En matière de validité du dénombrement des cas, deux principaux types de problèmes peuvent survenir (Rumeau-Rouquette et al. 1993) :

- le malade n'est pas reconnu comme tel : (auto-)exclusion du système de santé, erreur de diagnostic et de classification, risques compétitifs ;
- le malade est connu mais n'est pas enregistré dans le registre de morbidité : non exhaustivité de l'enregistrement ou absence d'accès à la prise en charge dans le cas des registres fondés sur la déclaration de prise en charge.

## Accès au diagnostic

Le diagnostic doit en premier lieu être porté. La plupart du temps, les statistiques sanitaires reposent sur un diagnostic médical établi chez des personnes venues consulter et ne peuvent donc prétendre à l'exhaustivité que si la maladie à enregistrer entraîne presque automatiquement une consultation médicale, une hospitalisation ou le décès.

Ce n'est pas le cas des NICI qui sont dans la majorité des cas découvertes de manière fortuite et par diagnostic d'élimination. On peut donc s'attendre à un sous-enregistrement des cas d'autant plus important que les populations les plus vulnérables vis-à-vis des NIC sont des populations en situation de précarité qui ont un accès limité au système de santé. En particulier, on s'attend à un sous-recensement des cas dans les zones rurales par rapport aux zones urbaines. D'après les médecins interrogés, la limitation à l'accès aux soins ne serait pas en premier chef due au coût de la consultation externe (4,5DT). En revanche, la distance entre le lieu d'habitation et le lieu de consultation, étant donné le nombre limité de consultations externes de néphrologie en Tunisie, est un facteur limitant d'accès à un dépistage relativement précoce. Ce phénomène est accru par le caractère d'évolution à bas bruit des Néphropathies Interstitielles Chroniques (NIC) vers une IRC décelable. Ceci implique également qu'une proportion possiblement importante des personnes atteintes d'une NIC décède avant d'avoir atteint le stade de prise en charge de l'IRC.

Le dépistage de l'Insuffisance Rénale Chronique pose également problème puisque plus de 50% des IRC sont « asymptotiques », c'est-à-dire que le patient ne ressent aucun symptôme, ou en tous cas rien de spécifique, hormis une fatigue générale. Les signes cliniques de cette affection sont longtemps non spécifiques (asthénie, anémie, hypertension, nausées, etc.), ce jusqu'à un stade très avancé voire terminal (Jungers 1999). Du fait de l'absence de « signal d'alarme », ces cas ne sont pas décelés. Leur diagnostic nécessite des examens biologiques complémentaires. Les stades précoces ne sont donc détectés que dans le cadre d'examens systématiques (population à risque ou campagne de dépistage en population générale). En 1998, 13% des cas d'IRC ont été découverts de manière fortuite au service de néphrologie du CHU de Monastir, 32% à l'occasion du suivi d'une autre pathologie, et seulement 19% suite à des signes rénaux (Sabra 2001). De même, la principale cause de consultation chez les patients atteints de NIC est l'IRC, la NIC évoluant à bas bruit quasi-systématiquement jusqu'à une IRC alors uniquement décelable par des signes d'urémie.

Ces informations illustrent un recours encore inégal aux soins spécialisés, notamment néphrologiques, lié à la fois à la limitation de l'offre et à celle de la demande en l'absence d'une sémiologie incitant les personnes à consulter. De plus, même en présence d'un suivi néphrologique, le diagnostic « histologique » et « étiologique » des maladies rénales considérées peut demeurer infaisable, surtout à un stade avancé.

## Diagnostic et Classification

Pour que le diagnostic soit exact, il faut que la définition de la maladie soit précise, fasse l'objet d'un consensus et que le diagnostic soit certain dans les conditions usuelles d'exercice de la médecine. Or dans le cas des NICI et de plusieurs autres types de NIC, on a affaire à un diagnostic « par défaut » ou reposant pour beaucoup sur des présomptions. En outre, si la nature et le nombre des examens ayant abouti au diagnostic de NICI varient dans les différents services hospitaliers, entre médecins et/ou entre patients (notamment en raison de la capacité de paiement liée à la couverture sociale), il y a un risque d'erreur différentielle de classification. Autrement dit, en l'absence d'une procédure standardisée de diagnostic, la

comparabilité des données concernant les cas de NICI diagnostiqués dans les trois services de néphrologie de Tunisie (Monastir, Sfax et Tunis) pose question. Nous présentons ici les étapes du diagnostic d'un cas d'IRC de cause NICI d'après l'interview d'un néphrologue du CHU de Monastir. La séquence commence par le diagnostic de l'IRC (1), dont les manifestations symptomatiques sont à l'origine de la démarche de consultation médicale. La pathologie primaire ayant évolué vers cet état d'IRC est alors recherchée par le médecin lors d'un entretien. Le diagnostic de NIC se fait par élimination des pathologies dont le tableau clinique est relativement simple à établir (2). En l'absence de présomption ou de preuves qu'une entité nosologique particulière est impliquée au sein des NIC, le diagnostic « néphropathie interstitielle chronique idiopathique » (NICI) est porté (3).

1. Diagnostic d'Insuffisance Rénale Chronique (IRC) : créatininémie ; les patients atteints d'IRC et venant consulter à la consultation externe sont en général à un stade modéré (créatininémie [200-400 $\mu\text{mol/l}$ ]) tandis que les patients admis aux urgences sont plus souvent à un stade terminal (créatininémie >800 $\mu\text{mol/l}$ ).
2. Diagnostic de Néphropathie Interstitielle Chronique (NIC) : élimination des diagnostics simples de pathologie primaire
  - Néphropathie glomérulaire : protéinurie, œdème.
  - Néphropathie vasculaire : hypertension artérielle, problèmes oculaires et cardiaques, parallélisme d'atteintes (reins atrophiés et symétriques).
  - Polykystose
  - **Néphropathie interstitielle**
    - Clinique : pas d'œdème ni d'HTA.
    - Biologique : hématurie, leucocyturie.
    - Radiologique : asymétrie des reins.
3. Diagnostic de NICI : élimination des NIC de cause connue
  - Infection urinaire récidivante
  - Lithiase
  - Uropathie malformative : asymétrie et dilatation des cavités à l'échographie.
  - Néphropathie héréditaire : sujets jeunes et antécédents familiaux.
  - Néphropathie secondaire à une pathologie : goutte (uricémie élevée), hémopathie, maladie de système, etc.
  - Néphropathie aux analgésiques (AINS, paracétamol, phénacétine, aspirine, vitamine C) : interrogatoire sur les douleurs et céphalées.
  - Néphropathie par intoxication aux métaux lourds ou aux oligo-éléments : interrogatoire sur la région de résidence, les expositions professionnelles ; signes cliniques tels que l'ostéomalacie et l'ostéoporose pour le cadmium, signes digestifs et neurologiques pour le plomb ; diagnostic certain impossible en l'absence de dosages sanguins et/ou urinaires.
  - **Néphropathie interstitielle de cause indéterminée** (NIC idiopathique)

Le seul examen permettant la confirmation histologique du diagnostic est la biopsie rénale qui ne peut que très rarement être pratiquée (moins de 5% des cas) en raison du stade fréquemment avancé de l'IRC au moment de sa découverte, avec deux petits reins, la grande fréquence de kystes séreux corticaux multiples et bilatéraux (surtout dans la population âgée), l'opposition de certains patients, leur état grabataire ou la présence de complications (Belhaj 2002).

La classification des maladies rénales initiales est effectuée selon les définitions et les codes recommandés par la European Renal Association, European Dialysis and Transplant Association (ERA-EDTA). Les éventuelles erreurs de codification ne nous sont pas ici accessibles en tant qu'objet d'étude.

## Exhaustivité de l'enregistrement

Le patient ne sera identifié dans le registre national des IRCT que s'il est pris en charge dans un centre de dialyse et signalé par ce dernier aux responsables du registre.

### *Des centres de diagnostic aux centres d'épuration extra-rénale (EER)*

Une fois le diagnostic porté et exact, il faut que le cas soit connu des structures chargées de l'enregistrement dans une zone donnée. Seulement trois centres hospitalo-universitaires possèdent un service de néphrologie en Tunisie et tous les patients atteints de troubles rénaux sont amenés à consulter dans l'un de ces trois services en fonction de leur lieu de résidence. Il y aurait donc identification entre structures de diagnostic de l'IRC terminale (services de néphrologie des hôpitaux de Monastir, Sfax et Tunis) et structures d'enregistrement (registres des mêmes hôpitaux). Cependant, une fois le diagnostic porté et enregistré, le dossier du patient est transféré à un centre de dialyse seulement dans la mesure où la décision de prise en charge a été prise par le néphrologue et approuvée par le patient.

Le bon transfert d'informations concernant le patient entre le CHU et le centre de dialyse est normalement assuré *via* un bilan de sorti établi par le staff du service de néphrologie.

La figure 5 schématise les parcours possibles d'un habitant atteint d'insuffisance rénale chronique et notamment terminale dans et hors le système de santé tunisien en indiquant les « points aveugles » conduisant à un non enregistrement des cas, soit qu'ils ne soient pas diagnostiqués, soit qu'ils se soustraient au système de prise en charge (hors déambulatoire) une fois le diagnostic porté.

### *Des centres d'EER au registre national des IRCT*

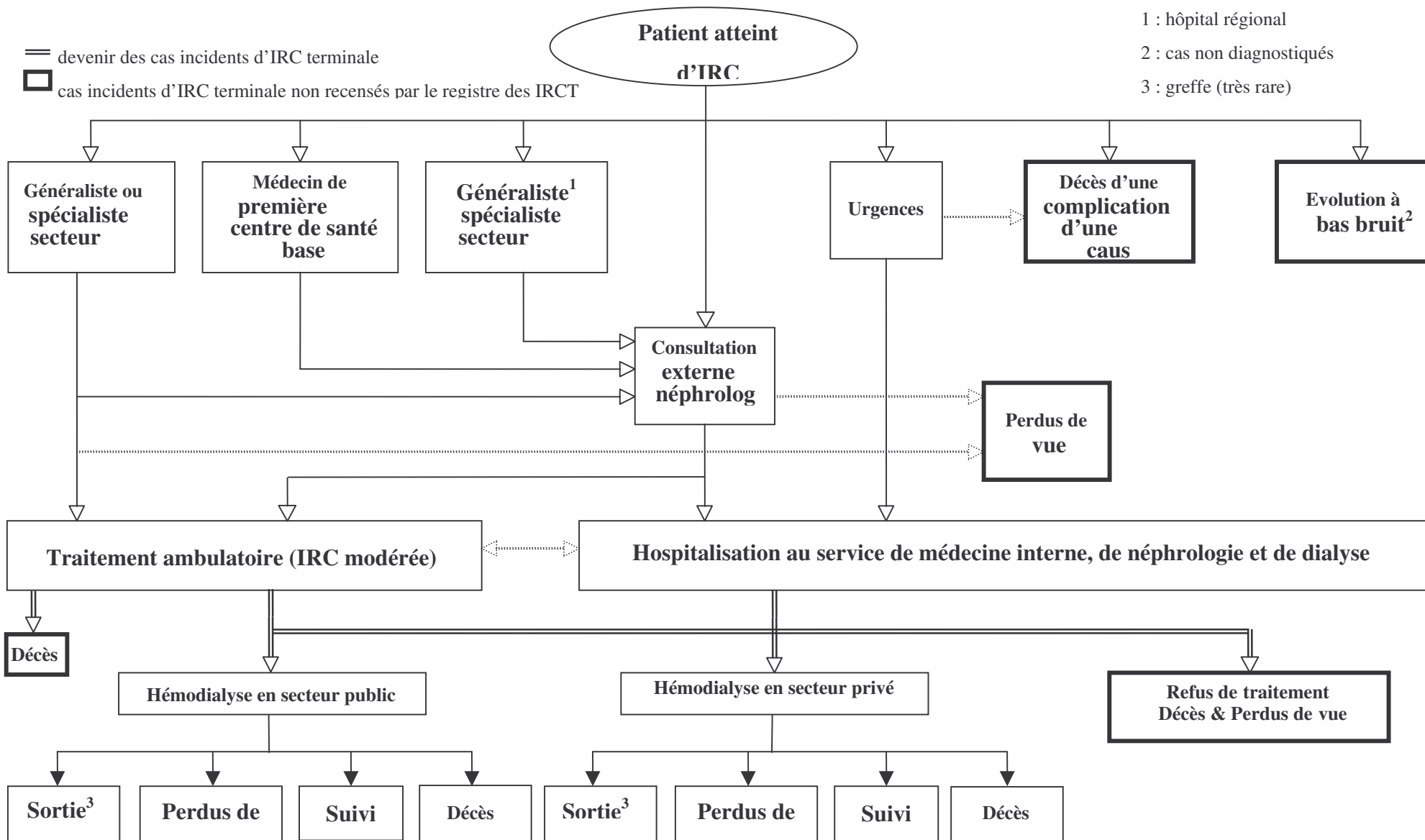
Le registre tunisien des Insuffisances Rénales Chroniques Traitées (IRCT) est un registre de type médico-administratif. Il est tenu par un médecin et un ingénieur du Ministère de la Santé Publique dans une optique de planification sanitaire. Tous les 6 mois, un imprimé type est envoyé à chaque centre de dialyse, qui doit retourner un rapport d'activité semestriel sous peine de sanctions administratives et financières, en particulier pour ce qui est des structures privées. Chaque centre doit donc retourner :

- Un rapport d'activité standardisé (formulaire) ;
- Une liste nominative des patients pris en charge (cas prévalents et incidents) indiquant nom, prénom, affiliation sociale, date de naissance, date de début de dialyse, néphropathie initiale (codification EDTA), statut viral (VHB, VHC), transferts et observations éventuelles ;

Le gouvernorat ou la ville d'origine du patient pris en charge ne sont pas consignés, ce qui limite la possibilité de faire des statistiques spatiales. Toutefois, le centre de dialyse dans lequel le patient est pris en charge est enregistré ; la région d'administration du traitement est donc connue, et correspond le plus souvent à la région de résidence. La catégorie socioprofessionnelle et d'autres indicateurs d'éducation ou de niveau socio-économique ne sont pas enregistrés pour le moment, en dehors du type d'affiliation à l'assurance maladie.

Les rapports sont envoyés par les centres d'hémodialyse depuis 1989 au moins, date à laquelle leur envoi est devenu obligatoire. Le taux de réponse des 122 centres avoisine les 100% et l'information est centralisée par une seule personne chargée de vérifier la qualité des données transmises et de compléter, le cas échéant, les données manquantes. Ceci ne prémunit certes pas contre la sous-déclaration du nombre de patients par oubli, laquelle est toutefois peu probable dans la mesure où le centre reçoit ses dotations sur la base de la déclaration du nombre de patients pris en charge et des séances d'hémodialyse administrées.

**Figure 5 : Parcours d'un habitant atteint d'Insuffisance Rénale Chronique (IRC) dans le système de santé tunisien**



On ignore par ailleurs avec quelle précision les rapports sont établis par les centres, en particulier en fonction du type d'information sollicité (l'âge par rapport à la pathologie primaire), pas plus que la comparabilité des informations fournies par les différents centres d'hémodialyse entre eux et dans le temps, en l'absence d'un formulaire standardisé de listing des patients et d'un historique des changements survenus dans la nature et la codification des données transmises.

Les facteurs limitant l'exhaustivité de l'enregistrement des cas d'IRC terminale en Tunisie sont donc essentiellement relatifs à l'accès au diagnostic et au traitement. La précision de l'enregistrement des informations individuelles, notamment en termes de pathologie primaire dont les NIC et les NICI, dépend probablement des pratiques de diagnostic mais aussi du soin apporté à la transmission de ce type d'informations, non indispensables en terme de planification sanitaire, des centres de diagnostic vers les centres de prise en charge et ultimement vers le registre.

### Caractéristiques individuelles des patients

*La date de première prise en charge* : ont été considérés comme « nouveau cas » pendant l'année n les malades ayant débuté un premier traitement par épuration extra-rénale (EER) entre le 1<sup>er</sup> janvier et le 31 décembre de l'année n. Les cas incidents ont par suite été identifiés à partir de la date de premier traitement.

*L'âge et le sexe* : à partir de la date de naissance et de la date de première prise en charge de l'IRC, nous avons calculé l'âge du patient (cas incident) au moment de sa première prise en charge. C'est l'âge en années révolues qui a été pris en compte pour le classement en groupes d'âge de 5 ans.

*La région de prise en charge* : l'information géographique disponible pour chaque patient concerne la région où il est pris en charge (localisation du centre de dialyse auquel il est rattaché) et non pas la région de résidence. Étant donné que les régions géographiques considérées sont étendues (regroupement des 24 gouvernorats en 7 grandes régions administratives, cf. tableau 2), et d'après les informations fournies par les responsables du registre, nous considérons cependant en première approche que la probabilité d'être traité dans une autre région que celle de résidence est faible, exception faite des zones « limitrophes » ou des régions particulièrement mal pourvues en infrastructures sanitaires, notamment en centres de dialyse.

*La pathologie primaire à l'IRC terminale* : nous regroupons les pathologies primaires identifiées selon la codification détaillée de l'ERA-EDTA (63 codes) en 7 catégories : néphropathies glomérulaires (NG), néphropathies vasculaires, y compris celles liées à une hypertension artérielle (NV), néphropathies (tubulo-)interstitielles chroniques (NIC), comprenant les NIC idiopathiques (NICI) que nous traitons également à part, néphropathies diabétiques (Ndiabétiques), polykystoses rénales (PKR) les causes indéterminées (Inconnues). La catégorie « Autre » n'est pas traitée ici.

*L'affiliation à un régime d'assurance maladie* : Les patients traités par épuration extra-rénale (EER) disposent en général d'une affiliation à la sécurité sociale : les personnes en situation de précarité bénéficient de l'Aide Médicale (partiellement) Gratuite (AMG) financée par la Caisse des Indigents (CI). Elles sont préférentiellement prises en charge dans les centres de dialyse publics. Les personnes prises en charge en centre de dialyse privé sont couvertes par la Caisse Nationale de Sécurité Sociale (CNSS, régime d'affiliation des salariés) ou par la

Caisse Nationale de Retraite et de Prévoyance Sociale (CNRPS, régime d'affiliation des fonctionnaires d'Etat).

#### Période considérée

Afin de pouvoir comparer nos résultats à ceux récemment publiés à propos de 9 pays d'Europe (Stengel et al. 2003) tout en mobilisant les données les plus fiables aux dires des responsables du registre, nous avons choisi d'extraire les données du registre relatives aux années 1992 à 2001, soit une période de 10 ans.

#### II.2.3 Données démographiques : recensement national

##### Correspondance entre les cas et la population de référence

La population de référence doit être définie selon les mêmes critères spatiaux, temporels et démographiques (âge et genre) que ceux ayant présidés à la définition des cas. Elle doit notamment faire l'objet de mises à jour régulières afin de tenir compte de ses évolutions temporelles entre deux recensements.

À partir des annuaires statistiques de la Tunisie couvrant les années 1992 à 2001 (INS 2000), nous avons extrait les effectifs estimés de la population tunisienne par année (au 1<sup>er</sup> juillet), par genre, par tranche d'âge de 5 ans et par région de résidence. Le recensement national de la population a lieu tous les 10 ans. Les effectifs consignés par l'INS pour les années 1992 à 2001 sont projetés à partir des données des recensements de 1984 et 1994 en tenant compte du taux annuel d'accroissement naturel et du « solde migratoire » par région. De plus, les données de 1999 à 2001 ont été actualisées en fonction des résultats de l'enquête nationale population-emploi de 1999.

Le nombre de nouveaux cas étant petit par rapport à la taille de la population soumise au risque de survenue de la pathologie (risque d'être malade), nous considérons que la taille moyenne de la population soumise au risque pendant la période de temps  $\Delta t$  courant du 1<sup>er</sup> janvier au 31 décembre de l'année calendaire considérée est approchée par la taille de la population au 1<sup>er</sup> juillet.

##### Délimitation des grandes régions tunisiennes

Nous avons utilisé le découpage géographique en 7 grandes régions adopté par l'INS (INS 2000). Les gouvernorats inclus dans chaque région sont consignés au tableau 2. À titre indicatif, nous donnons les effectifs de population estimés pour l'année 2000.

Région	Gouvernorat	Population (en milliers)
Tunis (district)	Tunis, Ariana, Ben Arous, Manouba	2055
N-E	Nabeul, Zaghouan, Bizerte	1305
N-O	Béjà, Jendouba, Le Kef, Siliana	1278
C-O	Kairouan, Kasserine, Sidi-Bouزيد	1378
C-E	Sousse, Monastir, Mahdia, Sfax	2081
S-O	Gafsa, Tozeur, Kébili	565
S-E	Gabès, Médenine, Tataouine	901

**Tableau 2** : Répartition des 24 gouvernorats tunisiens en 7 grandes régions géographiques et population au 1<sup>er</sup> juillet 2000.

### II.3 Estimation de l'incidence des IRCT

Les méthodes exposées aux paragraphes suivant sont classiques et font référence à l'ouvrage de Bouyer et al. (1995). Les taux sont exprimés en nouveaux cas par million d'habitants (pmh).

#### II.3.1 Estimation de l'incidence

##### Taux bruts

Le taux brut d'incidence relative à la période T est estimé par la formule (1) :

$$\hat{TI}(T) = \frac{m_T}{PA_T} \quad (1)$$

où :  $m_T$  est le nombre des nouveaux cas survenus pendant la période T ;

$PA_T$  est l'effectif moyen de la population tunisienne pour la période T ; si la période T correspond à l'année n, on utilise l'effectif estimé au 1<sup>er</sup> juillet de l'année n.

### Taux spécifiques

Les taux spécifiques - par âge, par genre, par cause, par période calendaire - sont estimés par la formule (2) qui donne l'exemple des taux spécifiques par tranche d'âge :

$$\hat{TI}_i(T) = \frac{m_{i,T}}{PA_{i,T}} \quad (2)$$

où :  $m_{i,T}$  est le nombre des nouveaux cas survenus dans la classe d'âge  $i$  pendant période  $T$  ;  
 $PA_{i,T}$  est l'effectif moyen de la population appartenant à la classe d'âge  $i$  pendant la période  $T$ . par analogie avec les taux bruts, lorsque  $T$  correspond à la période du 1<sup>er</sup> janvier au 31 décembre de l'année  $n$ ,  $PA_{i,T}$  est l'effectif dans la classe d'âge  $i$  au 1<sup>er</sup> juillet de l'année  $n$ .

En notant  $w_i$  le poids spécifique de la classe d'âge  $i$  par rapport à l'ensemble de la population soumise au risque pendant la période  $T$  :

$$w_i = \frac{PA_{i,T}}{\sum_i PA_{i,T}}, \text{ avec } \sum_i PA_{i,T} = PA_T,$$

on obtient :

$$\hat{TI}(T) = \sum_i w_i \cdot \hat{TI}_i(T) \quad (3)$$

On peut procéder de même par sexe et par région, et combiner ces trois variables pour obtenir les taux stratifiés (taux spécifiques) d'intérêt.

### Taux standardisés

Afin de rendre comparables les mesures de risque entre différentes périodes calendaires et différentes régions tunisiennes, c'est-à-dire pour pouvoir comparer les taux d'incidence de plusieurs populations sans que la structure d'âge (et de genre) n'intervienne, nous avons utilisé la méthode directe de standardisation (Pickle and White 1995) en prenant comme population de référence, stratifiée par tranche d'âge de 5 ans (et par genre) :

- La population tunisienne moyenne estimée en 1992-93 (INS 2000) pour la caractérisation des évolutions temporelles par périodes de deux ans entre 1992 et 2001 (tableau 3) ;
- La population tunisienne moyenne estimée en 1992-2001 (INS 2000) pour la recherche des variations régionales sur la même période ;
- La population européenne moyenne estimée en 1995 (Eurostat 1997) pour la comparaison des évolutions temporelles tunisiennes à celles relevées en Europe dans les années 90.

Le taux d'incidence standardisé par la méthode directe et correspondant à la période  $T$ , noté  $\hat{TI}_s(T)$ , s'obtient comme suit :

$$\hat{TI}_s(T) = \sum_i w'_i \cdot \hat{TI}_i(T) \quad (4)$$

Où les  $w'_i$  représentent les poids spécifiques de chaque tranche d'âge  $i$  dans la population de référence, c'est-à-dire que l'on remplace dans l'équation (3) les  $w_i$  de la population soumise aux incidences spécifiques  $\hat{TI}_i(T)$  par les  $w'_i$  de la population de référence. Le tableau 3 rapporte les poids spécifiques de par tranche d'âge et par sexe dans la population tunisienne pour la période 1992-93.

Groupe d'âge	Population biannuelle (1992-93)			Poids spécifiques ( $w'_i$ )		
	Hommes	Femmes	Tous	Hommes	Femmes	Tous
00-04	1022800	971500	1994300	0,119363	0,116282	0,117842
05-09	1064800	1013400	2078200	0,124265	0,121297	0,122800
10-14	1030400	982700	2013100	0,120250	0,117622	0,118953
15-19	927000	893900	1820900	0,108183	0,106994	0,107596
20-24	813300	795400	1608700	0,094914	0,095204	0,095057
25-29	704500	718700	1423200	0,082217	0,086023	0,084096
30-34	603700	608500	1212200	0,070453	0,072833	0,071628
35-39	494900	503100	998000	0,057756	0,060218	0,058971
40-44	379400	391600	771000	0,044277	0,046872	0,045558
45-49	289700	304800	594500	0,033809	0,036482	0,035129
50-54	276300	279800	556100	0,032245	0,033490	0,032860
55-59	268600	259300	527900	0,031346	0,031036	0,031193
60-64	236600	223500	460100	0,027612	0,026751	0,027187
65-69	173600	157200	330800	0,020260	0,018816	0,019547
70-74	128400	115500	243900	0,014985	0,013825	0,014412
75-79	82700	66600	149300	0,009651	0,007972	0,008822
80+	72100	69200	141300	0,008414	0,008283	0,008349
Total	8568800	8354700	16923500	1	1	1

**Tableau 3** : Population de référence et poids spécifiques pour la standardisation directe.  
Exemple : population tunisienne par tranche d'âge de 5 ans et par genre pour les années 1992-93.

### II.3.2 Calcul de l'intervalle de confiance

Nous avons considéré que deux taux ou proportions différaient significativement lorsque les intervalles de confiance ne se chevauchaient pas.

IC95% d'une proportion

Dans un échantillon de  $n$  sujets où la proportion observée vaut  $p_0$ ,  $q_0=1-p_0$  et la variance vaut :

$$Var(p_0) = \frac{p_0 \cdot q_0}{n} \quad (5)$$

L'intervalle de confiance à  $(100-\alpha)\%$  se calcule comme suit :

$$p_0 \pm Z_{\alpha/2} \cdot \sqrt{\text{Var}(p_0)} \quad (6)$$

où  $Z_{\alpha/2}$  est la valeur limite de la loi normale centrée réduite correspondant au risque  $\alpha$  choisi. Ici  $\alpha=5\%$ , on parle donc d'intervalle de confiance à  $95\%$  et  $Z_{\alpha/2}=1.96$ .

IC95% d'un taux brut

La variance du taux d'incidence brut  $\hat{TI}(T)$  est estimée par :

$$\text{Var}(\hat{TI}(T)) = \frac{m_T}{PA_T^2} \quad (7)$$

Par suite, l'intervalle de confiance à  $(100-\alpha)\%$  est donné par :

$$\hat{TI}(T) \pm Z_{\alpha/2} \cdot \sqrt{\text{Var}(\hat{TI}(T))} \quad (8)$$

IC95% d'un taux standardisé

La population de référence étant de grande taille, sa répartition par âge (et par genre) peut être considérée comme exacte et par suite, les  $w_i$  comme constants. La variance de  $\hat{TI}_s(T)$  est donc égale à :

$$\text{Var}(\hat{TI}_s(T)) = \sum_i w_i^2 \cdot \text{Var}(\hat{TI}_i(T)) \quad (9)$$

$$\text{Var}(\hat{TI}_i(T)) = \frac{m_{i,T}}{PA_{i,T}^2} \quad (10)$$

où :

Par suite, l'intervalle de confiance à  $(100-\alpha)\%$  est donné par :

$$\hat{TI}_s(T) \pm Z_{\alpha/2} \cdot \sqrt{\text{Var}(\hat{TI}_s(T))} \quad (11)$$

## II.4 Traitements statistiques complémentaires

Il faut garder en tête que les estimations de la fréquence des NICI en Tunisie que nous faisons ne sont autres que des réalisations de variables aléatoires dont la précision dépend essentiellement du nombre de cas recensés (numérateur). Dans le cas de régions peu peuplées ou pour lesquelles l'accès aux structures de soin, en particulier de type hospitalier, est limité, nous sommes confrontés à un nombre restreint de cas, ce d'autant plus que l'affection étudiée est relativement rare. Or plus le nombre de cas utilisés pour le calcul est restreint, plus la variabilité de l'estimation est grande et donc moins précise est l'estimation. Afin d'augmenter la précision, il nous faut donc augmenter le nombre de cas recensés. Les moyens dont nous disposons pour ce faire sont d'élargir la période d'observation, de regrouper les pathologies

causales en grandes catégories, et de ne pas stratifier les analyses sur le genre.

De plus, afin d'appréhender les variations temporelles et spatiales en dépit du caractère de rareté de l'IRCT, nous avons utilisé une régression de type Poisson en faisant appel à la procédure PROC GENMOD disponible sous SAS®.

Brièvement, le modèle de Poisson utilisé est de type log-linéaire (McCullagh and Nelder 1989) et s'écrit :

$$\log(E(Y_i)) = \log(t_i) + \beta'x_i \quad (12)$$

où :  $Y_i$  est le nombre de nouveaux cas observés dans le groupe  $i$  d'effectif total  $t_i$  (population soumise au risque de survenue de l'IRCT) pendant la période considérée,  $\beta'$  est un vecteur de coefficients de régression et  $x_i$  un vecteurs de co-variables qualitatives ou quantitatives relatives au groupe  $i$ . Les co-variables que nous avons utilisées varient selon l'analyse : région de prise en charge pour l'estimation du pourcentage annuel de variation des taux d'incidence ajustés sur l'âge et le sexe par pathologie primaire et taux d'incidence ajustés dans la tranche des 45 à 64 ans pour la prédiction des taux dans la tranche d'âge des 65 ans et plus (analyse des résidus).

Enfin, afin de comparer l'importance relative (proportion) des différentes catégories de pathologie primaire en fonction de la région de prise en charge, nous avons utilisé une régression de type logistique qui nous a permis d'estimer la relation (odds-ratio et IC95%) entre la probabilité de survenue de tel diagnostic primaire et la région où ce diagnostic a été porté. Nous avons pour ce faire appelé la procédure PROC LOGISTIC (SAS®).

Dans un modèle à réponse binaire, de type présence ( $Y=2$ ) ou absence ( $Y=1$ ) de la maladie, en notant  $x$  un vecteur de variables explicatives (ici la région), la probabilité  $p$  de survenue de la maladie chez un individu ou dans un groupe donné s'écrit (Cox and Snell 1989) :

$$p = \Pr(Y = 1 \mid x) \quad (13)$$

Le modèle logistique linéaire associé à l'estimation de cette probabilité est alors de la forme :

$$\logit(p) \equiv \log\left(\frac{p}{1-p}\right) = \alpha + \beta'x \quad (14)$$

où:  $\alpha$  est l'ordonnée à l'origine et  $\beta'$  est un vecteur de coefficients de régression.

La carte de l'incidence régionale de l'IRCT a été réalisée à l'aide du module EpiMap du logiciel EpiInfo™.

### III RESULTATS ET DISCUSSION

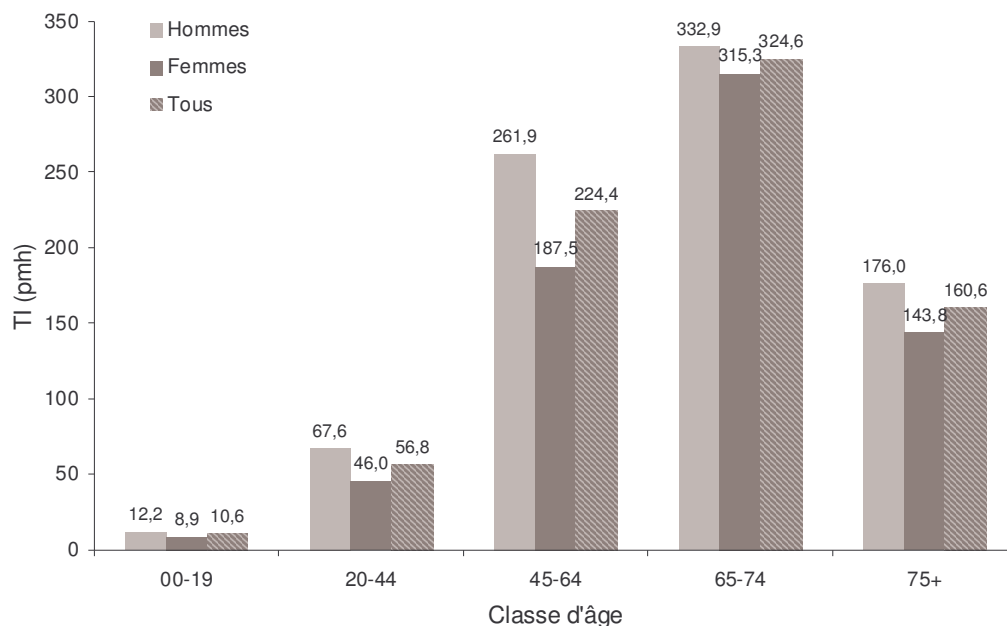
#### III.1 Incidence décennale (1992-2001)

6397 nouveaux cas d'IRCT- 3676 hommes (57.5%) et 2721 femmes (42.5%) - ont été recensés dans la population tunisienne pendant la période 1992-2001. Ceci correspond à une incidence brute globale de 70.3 pmh - 80.0 pmh chez les hommes et 60.4 pmh chez les femmes, soit un sexe-ratio de 1.3.

##### III.1.1 Incidence décennale globale

###### Taux spécifiques par âge

L'incidence spécifique de l'IRCT par classe d'âge pendant la période 1992-2001 (figure 6) illustre la prédominance de cette affection chez les 65-74 ans, parmi lesquels l'incidence globale atteint 324.6 pmh. La plus faible incidence relevée chez les sujets âgés de plus de 75 ans (160.6 pmh) peut s'expliquer par Moulton et al. (1992) : (1) une incidence véritablement moindre dans cette tranche d'âge ; (2) un accès encore limité aux soins spécialisés ; (3) une moindre prescription des traitements de suppléance liée à leur coût favorisant la prise en charge prioritaire des plus jeunes ; (4) le refus de traitement par EER chez les plus âgés, perçu comme lourd de conséquences en terme de qualité de vie. Nous reviendrons plus tard sur ces aspects dans l'étude des variations régionales d'incidence de l'IRCT (cf. III.3.1).



**Figure 6** : Taux d'incidence bruts d'IRCT toutes causes par classe d'âge et par genre. Tunisie entière, 1992-2001. Les intervalles de confiance à 95% sont rapportés en Annexe 1.

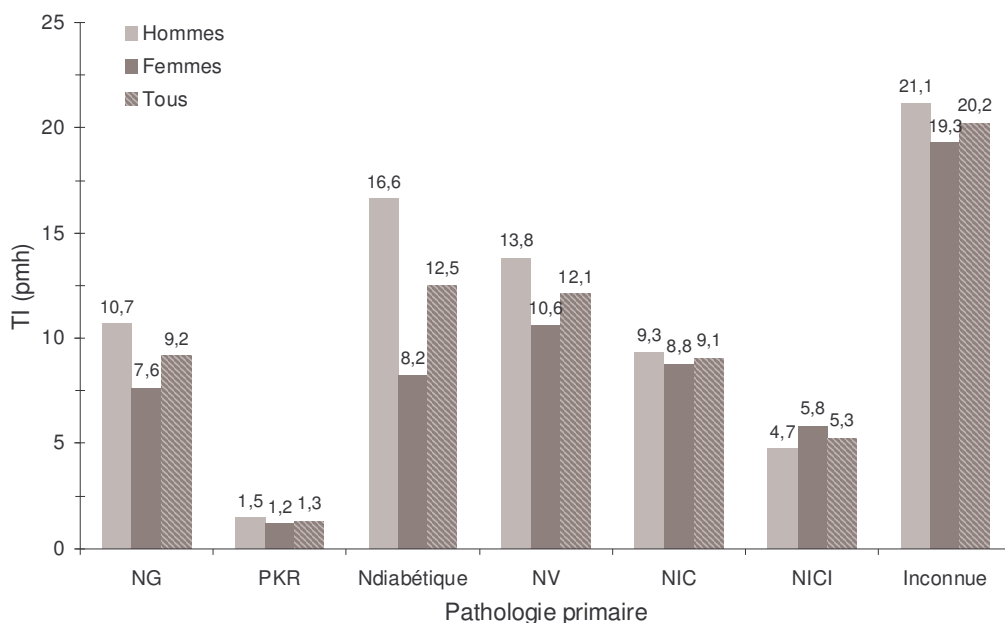
### Taux spécifiques par sexe

Le sexe-ratio (SR) homme:femme est de 1.3 sur la période considérée, indiquant une plus forte incidence chez les hommes que chez les femmes, tendance encore plus marquée dans 9 pays d'Europe (SR=1.6) (Stengel et al. 2003) et aux Etats-Unis (SR=1.5) (U.S. Renal Data System 2004). Sont incriminés des facteurs de susceptibilité génétiques et hormonaux (Silbiger and Neugarten 1995) ainsi que la plus grande fréquence chez les hommes des expositions toxiques professionnelles (Nuyts et al. 1995; Stengel et al. 1995) et des facteurs de progression tels que l'hypertension artérielle et autres facteurs de risque cardiovasculaire. En contraste avec les résultats publiés dans d'autres pays, la prédominance masculine ne s'accroît cependant pas avec l'âge (cf. figure 6) et tend même à diminuer chez les personnes âgées de 65 ans et plus (1.1 chez les 65-74 ans et 1.2 chez les plus de 75 ans contre 1.4 chez les 45-64 ans). Ceci pourrait être lié aux causes compétitives de mortalité affectant largement les hommes et/ou à une progression plus lente de l'affection chez les femmes aboutissant à un retardement de l'âge au diagnostic. Partant d'un niveau légèrement plus faible que celui des hommes dans les années 60, les femmes connaissent en effet aujourd'hui une longévité plus importante que les hommes (Ben Romdhane et al. 2002).

### III.1.2 Incidence décennale par pathologie primaire

#### Vue d'ensemble

La figure 7 rapporte les taux d'incidence bruts de l'IRCT en Tunisie par pathologie primaire sur la période 1992-2001. On constate une forte prédominance des causes indéterminées (20.2 pmh et 29% des cas incidents), suivies par les néphropathies diabétiques (12.5 pmh, 18%) et vasculaires (y compris hypertensives) (12.1 pmh, 17%). Les néphropathies glomérulaires (9.2 pmh, 13%) et interstitielles (9.1 pmh, 13%) suivent, loin devant les polykystoses rénales (1.3 pmh, 2%). Les néphropathies interstitielles idiopathiques, quant à elles, ont un taux d'incidence de 5.3 pmh, soit 8% des cas.



**Figure 7 :** Taux d'incidence bruts d'IRCT par pathologie primaire et par genre. Tunisie entière, 1992-2001. Les intervalles de confiance à 95% sont rapportés en Annexe 1.

Au niveau européen (9 pays), on retrouve en 1998-99 un classement relatif des pathologies primaires similaire, avec la prédominance des néphropathies diabétiques (23.6 pmh), des causes indéterminées (22.1 pmh), des néphropathies hypertensives et vasculaires (11.5 et 7.6 pmh), glomérulaires (16.3 pmh), tubulo-interstitielles (9.6 pmh) et toxiques (2.5 pmh), et enfin des polykystoses (6.9 pmh).

L'étude des évolutions temporelles et l'ajustement des taux tunisiens sur la population européenne nous livreront plus loin des éléments de comparaison plus détaillés (cf. III.2.).

#### Les pathologies primaires NIC et NICI

Le tableau 4 rapporte la fréquence d'occurrence des différentes causes de NIC au sein des cas d'IRCT diagnostiqués en Tunisie entre 1992 et 2001. On remarque la très forte proportion des cas de NIC idiopathique sur la période considérée (codes 20, 29 et 30 : 57.1% des cas), illustrant la difficulté à porter un diagnostic étiologique et/ou histologique à un stade avancé d'IRC, *a fortiori* au stade terminal nécessitant une prise en charge par EER.

Dans une étude de l'incidence des néphropathies interstitielles chroniques dans la région Centre entre 1992 et 1998, Kaiss (1999) rapportent « seulement » 34% de causes indéterminées. Ceci peut s'expliquer par le fait que 25% « seulement » des cas diagnostiqués nécessitaient d'emblée une prise en charge par EER (IRCT). De même, Sabra (2001) recense en 1998 26% d'IRCT parmi les cas incidents d'IRC dans cette même région, dont plus de la moitié pris en charge en urgence par EER en l'absence d'un suivi néphrologique préalable.

La cause identifiée la plus fréquente est la lithiase rénale ou urinaire (22% des cas). Barsoum (2003) rapporte que les calculs comptent parmi les causes courantes de néphropathies interstitielles en Afrique du Nord (Maroc, Algérie, Tunisie, Libye et Egypte). Aux Etats-Unis également, le groupe « lithiase, uropathies obstructives et goutte » était la première cause d'IRCT de cause NIC pour la période 1998-2002 (36% des cas), comparable aux 33% des cas dont ces trois pathologies sont responsables en Tunisie.

Code EDTA	Intitulé de la pathologie primaire	n	%
<b>20</b>	Pyélonéphrite/NI de cause non précisée	367	<b>43,7</b>
25	Pyélonéphrite/NI due à une lithiase rénale/urinaire	183	21,8
<b>30</b>	NI autre cause ou de cause non précisée (non citée)	80	<b>9,5</b>
22	Pyélonéphrite/NI due à une uropathie obstructive congénitale avec ou sans reflux vésico-urétéral	50	6,0
24	Pyélonéphrite/NI due à un reflux vésico-urétéral sans obstruction	50	6,0
23	Pyélonéphrite/NI due à une uropathie obstructive acquise	33	3,9
<b>29</b>	Pyélonéphrite/NI due à une autre cause (non citée)	33	<b>3,9</b>
21	Pyélonéphrite/NI associée à une vessie neurologique	18	2,1
92	Néphropathie due à l'acide urique (rein goutteux)	12	1,4
31	Néphropathie due aux analgésiques	6	0,7
93	Néphropathie due à une hypercalcémie ou néphrocalcinose	4	0,5
39	Néphropathie due à un autre médicament (non cité)	3	0,4
34	Néphropathie due au plomb	1	0,1
-	Total NIC	840	100

En gras, les codes EDTA retenus pour définir la catégorie Néphropathie Interstitielle (NI) Chronique Idiopathique (**NICI**).

**Tableau 4** : Intitulés et fréquences de survenue (cas incidents d'IRCT et %) des pathologies primaires dans la catégorie « Néphropathies Interstitielles Chroniques » (NIC).

D'après la nomenclature de l'ERA-EDTA. Population tunisienne, 1992-2001.

L'âge médian des cas incidents d'IRCT de cause NIC et NICI en 2001 est respectivement de 52 et 51.5 ans, légèrement inférieur à celui de l'ensemble des IRCT diagnostiquées la même année (55 ans). Hormis pour l'année 1992, l'âge des femmes prises en charge pour une IRCT de cause NICI est systématiquement plus élevé que celui des hommes, de 3 à 9 ans en moyenne, indiquant probablement des phénomènes relatifs aux différences de genre dans l'incidence et la prise en charge de l'IRC terminale en général (cf. III.2.1).

Le ratio homme:femme sur l'ensemble de la période 1992-2001 est de 9.3:8.8 (1.1) pour les NIC et 4.7:5.8 (0.8) pour les NICI (cf. figure 7). La NICI est la seule affection pour laquelle on observe en Tunisie un sexe-ratio inférieur à 1. Elle représente près de 10% des cas d'IRCT recensés chez les femmes sur la période, et seulement 6% chez les hommes.

La tranche d'âge dans laquelle le sexe-ratio est le plus bas pour la NICI est celle des 45-64 (0.55), âges pour lesquels l'incidence est probablement plus « fidèlement » estimée grâce à un accès aux soins relativement « ubiquitaire ».

Dans la littérature néphrologique, la plupart des affections rénales présente un sexe-ratio largement supérieur à 1, ce quelque soient les populations considérées, à l'exception du reflux vésico-urétéral, des néphropathies toxiques (liées aux analgésiques) (Stengel et al. 2003), et de manière tout à fait intéressante, de la NEB (SR=0.6) (Ceovic et al. 1992).

Ceci nous laisse à penser que la plus grande fréquence des NICI observée chez les femmes tunisiennes pourrait être liée :

- à un recours plus tardif des femmes atteintes de NIC au diagnostic donc à la prise en charge comme le suggère l'âge moyen plus élevé ;
- à une sous-estimation des causes de type néphropathie aux analgésiques liée à un défaut de diagnostic (interrogatoire non exhaustif et biais de réponse notamment) ;
- à l'existence d'une atteinte tubulo-interstitielle semblable à la NEB, la NIK décrite plus haut par exemple, à laquelle les femmes seraient plus sensibles et dont le diagnostic serait impossible à établir en l'absence de biopsie rénale.

Cette dernière hypothèse, évoquée par Barsoum (2003) pour expliquer l'augmentation de 13 à 23% de la contribution des NIC à l'IRCT en Egypte au cours des 10 dernières années, pourrait être à l'origine d'une part des causes indéterminées parmi les cas de NIC aussi bien chez les femmes que chez les hommes tunisiens. L'hypothèse du recours tardif au système de soins est également probable dans les deux sexes chez les patients en situation de précarité sociale et économique qui, d'après les médecins néphrologues tunisiens interrogés, sont largement représentés au sein du diagnostic NICI.

Il est à ce titre intéressant de noter que deux groupes de pathologies se dessinent au regard de la proportion de patients en situation de précarité tel qu'estimée par le pourcentage de patients bénéficiant de l'aide médicale (partiellement) gratuite (AMG) :

- un premier groupe dans lequel ils représentent 10 à 11% des cas incidents d'IRCT : néphropathies vasculaires, diabétiques et polykystoses rénales ;
- un second groupe dans lequel la proportion varie entre 26 et 29% : les néphropathies glomérulaires, interstitielles, en particulier idiopathiques, et les causes inconnues.

Nous reviendrons plus loin sur ce point qui suggère l'implication de facteurs de risque distaux, de type socio-économiques, dans la survenue de ces affections. Certes un bas niveau socio-économique est dorénavant et déjà identifié comme facteur de risque de l'IRC dans la

littérature néphrologique, mais jusqu'ici relativement aux origines diabétiques et hypertensives (Byrne et al. 1994; Cass et al. 2004; Perneger and al. 1995a; Perneger et al. 1995b).

L'étude des évolutions temporelles de la force d'incidence des IRCT en fonction de l'âge, du sexe et de la pathologie primaire devrait nous renseigner plus avant sur les particularismes tunisiens.

## III.2 Évolutions temporelles

### III.2.1 Âge des cas incidents

L'âge médian des patients au moment de la première prise en charge n'a cessé d'augmenter durant cette décennie, passant de 46.4 ans en 1992 à 55.5 ans en 2001. Ainsi, la proportion des patients âgés de plus de 65 ans est-t-elle passée de 11.7% en 1992-93 à 28.0% en 2000-01. En France aussi, le vieillissement de la population des insuffisants rénaux traités a été constant, comme en témoignent l'augmentation de 10 ans de l'âge moyen de cette population entre 1980 et 1994 et la multiplication par trois de la proportion des plus de 65 ans parmi les nouveaux patients qui sont passés de 11 à 30% entre 1982 et 1992 (Jacobs and Selwood 1995). Une « épidémie de vieillesse » a été observée de manière encore plus marquée dans l'ensemble des pays d'Europe couverts par le registre de l'ERA-EDTA depuis le début des années 80 : ainsi, 48% des cas incidents étaient âgés de 65 ans et plus en 1999 contre 22% en 1985 (Jager et al. 2003). Des tendances similaires ont été observées aux Etats-Unis, au Japon (Yamagata et al. 2004), en Australie et Nouvelle-Zélande (McDonald et al. 2002), ainsi qu'en Angleterre, quoique plus modérément en raison de restrictions importantes dans les budgets de santé (Feest et al. 2005; Stanton 1999).

Ce vieillissement est probablement lié à l'élargissement des indications des traitements de suppléance chez les plus âgés ainsi qu'à un réel retardement de l'âge au moment de l'apparition de la maladie :

- L'élargissement des indications : un meilleur accès au diagnostic et à la prise en charge de ce type d'affections, notamment lié au rapprochement des centres de soin, et plus marqué chez les plus âgés au cours de la décennie passée, est attesté par les responsables du registre tunisien impliqués dans la planification sanitaire de la prise en charge de l'IRCT par épuration extra rénale ;
- Le retardement de l'âge à l'apparition de la maladie : un meilleur accès aux soins en général entraîne d'une part une meilleure prise en charge des facteurs de progression et donc retarde le début de traitement de suppléance, et d'autre part une diminution de la force d'incidence de certains facteurs de risque compétitifs permettant à certains cas d'IRC d'atteindre le stade terminal là où ils seraient décédé auparavant.

Parallèlement, une meilleure prise en charge des facteurs d'initiation (lithiase et diabète, par exemple) aurait tendance à diminuer le nombre de nouveaux cas (prévention primaire). Cette tendance à la prise en charge pouvant être plus « assidue » vis-à-vis des jeunes, l'effectif relatif des personnes âgées serait en augmentation.

L'âge médian est systématiquement plus élevé chez les femmes que chez les hommes (de l'ordre de moins d'un à plus de six ans) au cours de la période. Ceci pourrait indiquer soit un recours plus tardif aux soins spécialisés (dépistage) et à la prise en charge, soit une

progression plus lente de l'IRC vers le stade nécessitant une EER liée à des facteurs génétiques ou des habitudes de vie, quoi que cette hypothèse ait récemment été remise en cause dans des populations nord-américaines (Jafar et al. 2003). La première hypothèse, confirmée aux Etats-Unis notamment (Kausz et al. 2000) tendrait cependant à être infirmée par les teneurs comparables de créatinine sérique à laquelle les cas d'IRC ont été découverts dans les deux sexes au sein d'une série de 300 cas hospitalisés au service de néphrologie de Monastir au cours de l'année 1998 (Sabra 2001).

### III.2.2 Incidence biannuelle par tranche d'âge et par sexe

Le tableau 5 rapporte les évolutions de l'incidence de l'IRCT par période de deux ans en fonction du sexe. On observe une augmentation régulière du taux d'incidence de l'IRCT dans la population tunisienne entre 1992 et 2001. La progression annuelle de l'incidence sur cette période est évaluée à +7.1% avec une standardisation sur la population tunisienne (1992-93, cf. tableau 5) et +8.6% en standardisant sur la population européenne (1995, cf. figure 10). Par suite tous les taux d'accroissement rapportés sont calculés sur la base de l'ajustement européen à titre de comparaison. Cette tendance à l'augmentation de l'IRCT est constatée dans la plupart des pays industrialisés, et notamment en Europe Centrale et de l'Est (Rutkowski 2000), aux Etats-Unis (U.S. Renal Data System 2004), en Nouvelle-Zélande (+6.5% par an) et Australie (+9%) (Disney 1995; Disney 1998; McDonald et al. 2002), au Canada (+6.1%) (Canadian Organ Replacement Register 2001) et au Japon (+11%) (Usami et al. 2000). Dans la « Vieille Europe » (9 pays participant au registre ERA-EDTA), la progression est en général constante quoique moins forte, en moyenne de 4.8% par an, avec toutefois d'importantes disparités géographiques (de 3.1% pour l'Autriche à 6.4% pour le Danemark).

Population de référence	Sexe des patients	Taux d'Incidence IRC traitée (pmh)				
		1992-93	1994-95	1996-97	1998-99	2000-01
Tunisie 1992-93	Hommes <sup>a</sup>	55.2	59.0	70.5	90.5	103.3
	Femmes <sup>a</sup>	37.5	41.5	49.6	72.6	78.1
	Tous <sup>b</sup>	46.4	50.4	60.2	81.7	90.9
Europe 1995	Hommes <sup>a</sup>	85,5	96,0	119,1	151,0	180,9
	Femmes <sup>a</sup>	61,5	71,5	90,0	135,4	153,2
	Tous <sup>b</sup>	73,7	84,1	105,0	143,0	166,9

Taux ajustés sur l'âge (a) et le sexe (b) selon la population de référence indiquée.

**Tableau 5 :** Évolution biannuelle de l'incidence de l'IRCT selon le sexe.

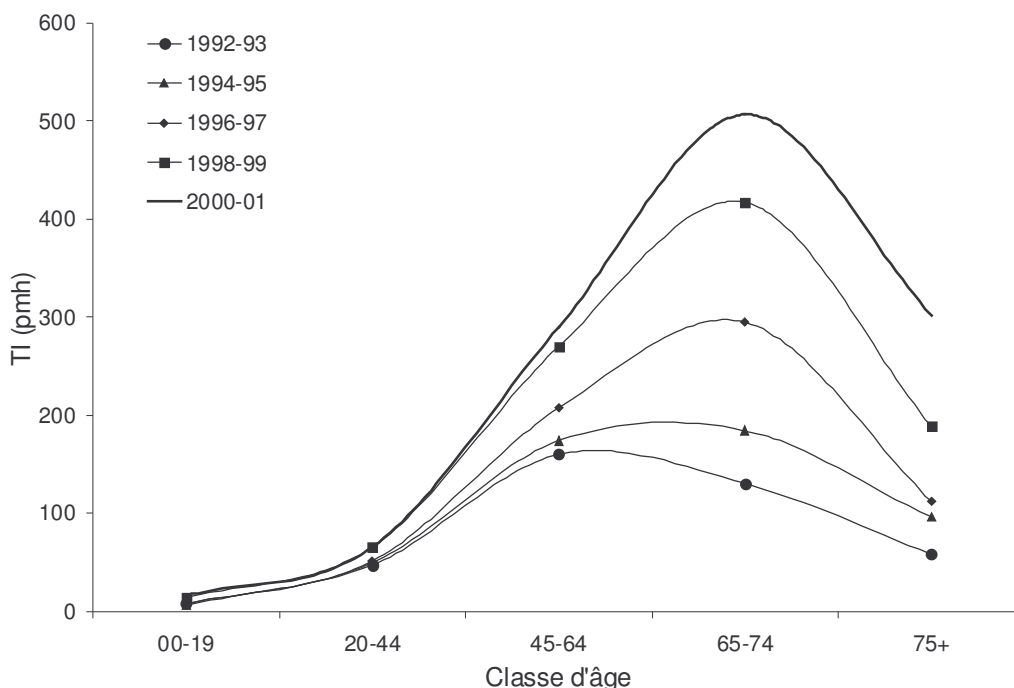
Le taux d'incidence atteint en 2000-2001 en Tunisie (166.9 pmh, standardisation sur la population européenne) est très supérieur à celui estimé pour 9 pays d'Europe en 1998-99 (117.1 pmh, cf. tableau 6) et pour 7 régions françaises en 2003 (118 pmh) (REIN 2005). Il demeure toutefois très en-deçà des taux états-uniens (328 pmh en 2001) (U.S. Renal Data System 2004) et japonais (238 pmh en 1998) (Usami et al. 2000). L'incidence rapportée en 2002 en Allemagne (160 pmh) est comparable (ERA-EDTA Registry 2004).

La plus forte incidence observée en 2000-01 en Tunisie par rapport à 9 pays d'Europe en dépit d'un accès au traitement de suppléance probablement encore inférieur étant donné la corrélation observée entre PIB et prise en charge (Barsoum 2002a; Barsoum 2002b) pourrait s'expliquer par le fait que la Tunisie est entrée dans une phase de transition épidémiologique.

Celle-ci se traduit par le déclin des maladies transmissibles (infectieuses) - tout de même encore plus fréquentes que dans les pays développés - et l'augmentation des maladies chroniques non transmissibles dans un contexte d'évolution rapide de l'environnement socio-économique, démographique et alimentaire (Ben Romdhane et al. 2002). L'analyse de l'évolution des diagnostics de pathologies primaires semble aller dans ce sens (cf. III.2.3).

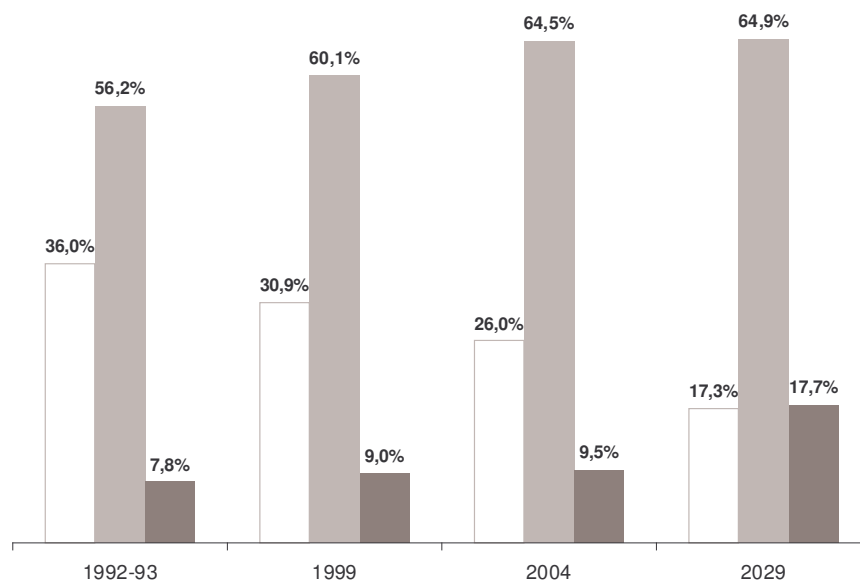
Contrairement aux résultats européens, cependant, nous observons une augmentation plus rapide de l'incidence chez les femmes que chez les hommes au cours de la période (+9.6% par an contre +7.6%), confirmée quelque soit la pathologie primaire, à l'exception des causes inconnues, même si les taux féminins restent largement inférieurs. Un rattrapage relatif de l'inégalité d'accès aux soins, une diminution progressive du différentiel de style de vie et des facteurs de risque associés, et l'importance potentielle des toxémies gravidiques pourraient expliquer une partie de cette accélération chez les femmes.

La figure 8 rapporte les taux spécifiques par classe d'âge calculés par période de deux ans. C'est dans la classe des plus de 75 ans que l'augmentation de l'incidence globale a été la plus marquée entre les périodes 1992-1993 et 2000-2001 : l'incidence est passée de 58.5 à 302.3 pmh dans ce groupe (+17.8% par an) alors qu'elle progressait de 130.5 à 506.9 pmh chez les 65-74 ans (+14.5%), de 160.4 à 290.0 pmh chez les 45-64 ans (+6.1%) et « seulement » de 47.6 à 65.9 chez les 20-44 ans (+3.3%). En Europe également, on constate une nette progression de l'IRCT chez les plus âgés (triplement de l'incidence entre 1990-91 et 1998-99, +15.3% par an) qui est moins accentuée chez les 65-74 ans (+7.1%) et encore moins chez les 45-64 ans (+2.8%), l'incidence étant stable chez les 20-44 ans (Stengel et al. 2003). Là encore de fortes disparités géographiques sont toutefois relevées.



**Figure 8** : Courbes d'incidence brute d'IRCT toutes causes.  
Par classe d'âge en fonction de la période calendaire.

Ces résultats décennaux illustrent les efforts réalisés au niveau national pour améliorer l'accès au diagnostic et au traitement de suppléance chez les plus âgés. Étant donné les projections faites par l'INS quant au vieillissement de la population tunisienne (Figure 9), cette tendance devrait se confirmer dans les années à venir, comme on l'observe dans les pays où l'incidence de l'IRCT ne cesse d'augmenter en raison du vieillissement de la population (recul des certaines causes compétitives de décès), de l'amélioration de la prise en charge, et de l'augmentation de l'incidence de facteurs d'initiation et de progression tels que le diabète de type 2 et l'hypertension artérielle.



**Figure 9** : Structure de la population tunisienne (%) par tranche d'âge et selon l'année. Blanc : 0-14 ans ; Gris clair : 15-59 ans ; Gris foncé ; 60 ans et plus. 2004 et 2029 : projections de l'INS.

### III.2.3 Incidence biannuelle par pathologie primaire

#### Les pathologies primaires « courantes »

Le tableau 6 consigne les évolutions comparatives de l'incidence de l'IRCT par pathologie primaire en Tunisie et dans 9 pays d'Europe (la zone considérée comprend la Belgique, l'Espagne, L'Autriche, le Danemark, la Grèce, la Suède, l'Écosse, les Pays-Bas, la Norvège et la Finlande). Nous retrouvons dans l'ensemble au niveau tunisien les tendances observées au niveau européen, à savoir une rapide augmentation de l'IRCT liée au diabète (+14% [10.6 ; 17.6] en Tunisie et +5.9% [5.0 ; 6.9] dans 9 pays d'Europe) et aux néphropathies vasculaires y compris liées à une hypertension artérielle (+5.8% [4.5 ; 7.2] en Tunisie).

L'importance des néphropathies diabétiques et vasculaires au sens large ne cesse d'augmenter dans l'ensemble des pays développés et en développement (Barsoum 2002b). Comme en Europe, les néphropathies glomérulaires évoluent peu sur la période. Elles occupent en Tunisie une place beaucoup moins importante que sur le vieux continent où elles représentent la seconde cause identifiée d'IRCT. Cette cause est également en tête du classement des pathologies primaires dans l'ensemble des pays en développement (Barsoum 2002b) et dans les pays à revenu intermédiaire d'Afrique du Nord (Barsoum 2003).

Pathologie Primaire	Europe <sup>a</sup>		Tunisie	
	1990-91	1998-99	1992-93	2000-01
Toutes causes	-	-	73.7	166.9
	79.4	117.1	-	-
NG	15.6	16.3	11.8	13.5
PKR	6.0	6.9	2.3	2.0
NV	3.6	7.6	14.7	25.8
N-HTA	6.3	11.5	-	-
Ndiabétique	12.7	23.6	9.9	35.9
NIC-NTI	9.6	9.6	8.6	21.0
NToxique	2.7	2.5	-	-
NICI	-	-	6.2	12.3
Inconnue	11.2	22.1	19.0	56.3

(a) d'après (Stengel et al. 2003) ; N-HTA : néphropathie liée à une hypertension artérielle ; NV : cette catégorie comprend les NV et les N-HTA dans la classification tunisienne ; NToxique : Néphropathie toxique ; NIC-NTI : néphropathies interstitielles et tubulo-interstitielles ; cette catégorie comprend les NToxiques dans la classification tunisienne.

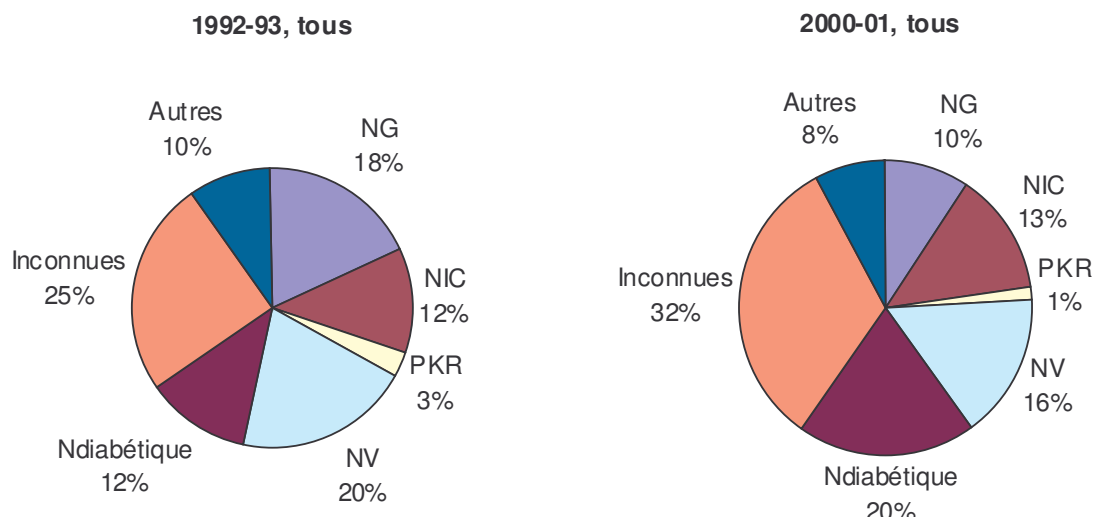
**Tableau 6 :** Évolution décennale de l'incidence de l'IRCT par pathologie primaire (pmh). Europe et Tunisie. Taux ajustés sur l'âge et le sexe. Population de référence : Europe 1995.

Ce relatif déficit de cas d'IRCT associées à une NG pourrait en partie s'expliquer si l'on admet la possibilité que parmi les cas d'IRCT de cause indéterminée identifiés en Tunisie, un certain nombre de patients atteints d'une NG et étant référés tardivement à un néphrologue puissent ne pas être reconnus comme tels. En effet, la confirmation du diagnostic de la sclérose glomérulaire segmentaire, par exemple, nécessite une biopsie d'autant plus rarement réalisée que le stade d'IRC est avancé (Ball et al. 2001).

Une moindre contribution des NG dans l'ensemble des IRCT est toutefois observée en Egypte et dans d'autres pays à revenus intermédiaires et pourrait s'expliquer à la lumière d'une meilleure prophylaxie des infections endémiques couramment à l'origine des NG dans les pays « en développement » (Barsoum 2002b).

Les figures 10a et 10b illustrent l'évolution de l'importance relative des différentes pathologies primaires entre 1992-93 et 2000-01 en Tunisie.

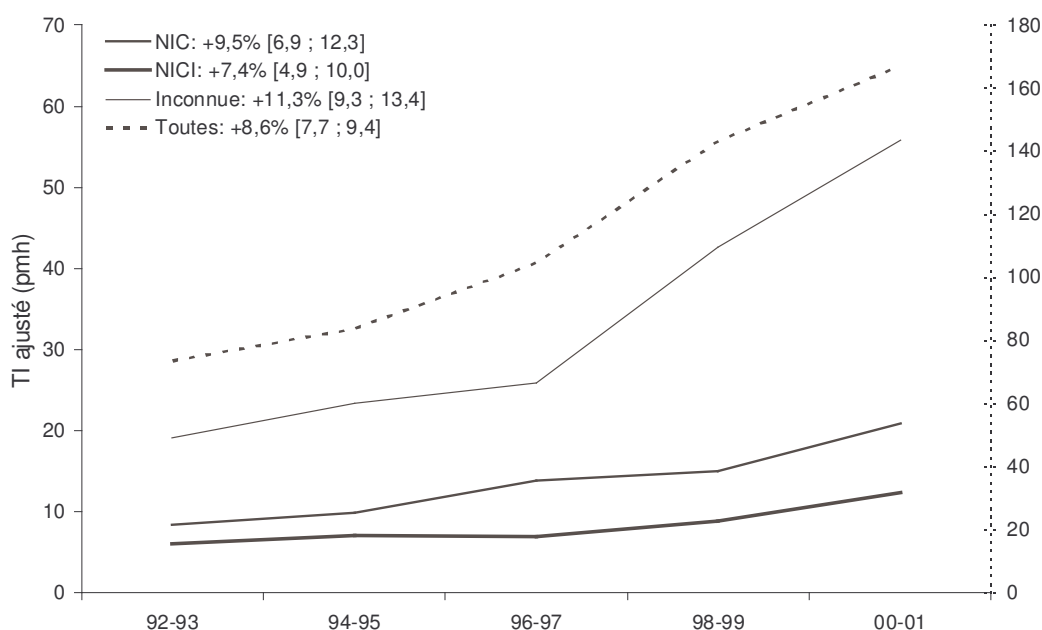
La distribution relative des néphropathies initiales chez les hommes et les femmes à la fin de la période d'étude (2000-01) diffère comme suit : les hommes ont plus fréquemment un diagnostic déclaré de néphropathie inconnue (30%) et diabétique (23%) ; les femmes, 35% de diagnostics inconnus, 16% de néphropathies diabétiques et 15% de néphropathies interstitielles (dont 66% de cause indéterminée). Contrairement aux données françaises (REIN 2004), on n'observe pas de différence pour les glomérulonéphrites et néphropathies hypertensives ou vasculaires (environ 10 et 16% respectivement dans les deux sexes).



**Figure 10** : Proportion des cas incidents d'IRCT en fonction de la pathologie primaire. Tunisie entière. (a) : 1992-93. (b) : 2000-01.

#### Les pathologies primaires NIC et NICI

Le détail de l'évolution décennale est donné en figure 11 pour les cas d'IRCT associés à une NIC, une NICI, et les causes inconnues ainsi que pour la totalité des cas. La tendance la plus intéressante par rapport à la problématique OTA est l'augmentation rapide de l'incidence des cas d'IRCT de cause NIC (+9.5% [6.9 ; 12.3]) dont les NICI (+7.4% [4.9 ; 10.0]) dans la population tunisienne entre 1992 et 2001, alors que dans neuf pays européens, ces pathologies primaires présentent une incidence stable entre 1990 et 1999 (cf. tableau 6).



**Figure 11**: Courbe d'incidence biennale d'IRCT (pmh) par cause et % annuel de variation. Taux ajustés sur l'âge et le sexe. Population de référence : Europe 1995. NIC, NICI, Inconnue : axe de gauche ; Toutes : axe de droite.

Ainsi, si les incidences étaient semblables en Tunisie et dans ce groupe de pays européens au début des années 90, l'incidence tunisienne des NIC est deux fois plus importante au début des années 2000, doublement auquel les NIC idiopathiques contribuent largement. L'utilisation de plus en plus fréquente de médicaments anti-douleur, surtout chez les femmes, les expositions environnementales et professionnelles, et des expositions alimentaires telles que l'ingestion d'OTA pourraient ne pas y être étrangers.

Une autre évolution très marquée, derrière les néphropathies diabétiques et devant les NIC, est celle des IRCT de cause indéterminée dont l'incidence a triplé sur la période (+11.3% [9.3 ; 13.4]) et « seulement » doublé dans le cas européen. Cette très forte proportion de causes incertaines en Tunisie (29% des cas incidents) pourrait s'expliquer (Ball et al. 2001) :

- par un passage chez certaines personnes de la situation : « pas d'accès aux soins » (auto-exclusion, raison économique, distance de l'habitation au centre de consultation et de prise en charge) à celle d'un « accès tardif » à des stades avancés ; si ces cas qui n'étaient donc pas détectés auparavant (décès des suites de l'IRC ou d'une cause compétitive avant le diagnostic), ils le sont désormais, mais tardent encore à recourir au système de santé ;
- par la nature même de l'affection rénale sous-jacente, elle-même en rapide augmentation mais asymptomatique jusqu'à un stade avancé auquel son diagnostic devient incertain ;
- et, en interaction probable avec les deux premiers points, aux pratiques locales de diagnostic par le néphrologue référant en situation d'incertitude.

Ces arguments peuvent être mis en regard de l'augmentation globale de l'âge médian des cas incidents d'IRCT entre 1992 et 2001 évoquée plus haut, augmentation plus forte dans le groupe des causes indéterminées (de 48 à 57 ans).

Les néphropathies interstitielles idiopathiques, mais aussi, dans une certaine mesure, d'autres affections pouvant évoluer à bas bruit, présentent un diagnostic difficile, même en présence de biopsie et autres examens complémentaires. Certains types de néphropathies glomérulaires qui sont relativement peu représentées dans la population tunisienne puisqu'elles arrivent au même rang que les NICI pourraient donc aussi entrer dans cette catégorie (cf. supra).

Ceci nous renvoie notamment au phénomène de « late referral » (pas ou peu de suivi, inférieur à un à trois mois, avant le début de la prise en charge) qui concernait encore 68% des nouveaux cas d'insuffisance rénale prise en charge par EER dans la région Centre en 1998. Seulement 16% étaient suivis pendant plus de 6 mois et 58% étaient directement hospitalisés aux urgences, dont 75% en l'absence de suivi préalable (Sabra 2001). Dans quatre régions françaises, la proportion des patients pris en charge en urgence variait entre 26 à 46% en 2002 (REIN 2004), illustrant le problème encore largement universel que le diagnostic de l'IRC pose en dehors des programmes ciblés de dépistage systématique à un stade « infra-clinique ».

Nous avons évoqué plus haut la possible contribution des NIC et des NG dans cette catégorie de causes indéterminées, alléguant leur évolution asymptomatique jusqu'à des stades avancés et/ou la difficulté de leur diagnostic. Un argument en faveur de cette hypothèse nous est fourni par l'observation de l'âge médian des patients en fonction de la pathologie primaire, soit par ordre décroissant : 57.5 ans pour les néphropathies diabétiques, 56.9 pour les néphropathies vasculaires et hypertensives, 56.0 pour les PKR, 53.4 pour les causes indéterminées, 48.5 pour les néphropathies interstitielles et 41.2 pour les néphropathies glomérulaires. Le fait que l'âge médian observé dans ces deux derniers groupes soit inférieur à celui du groupe des causes indéterminées pourrait aller dans le sens d'un certain nombre de

cas de NIC ou de NG évoluant à bas bruit chez des personnes étant prises en charge tardivement, à un âge et à un stade avancé d'IRC où le diagnostic de la pathologie primaire est incertain. En dehors du groupe des causes indéterminées, les différences relatives d'âge entre les groupes de pathologies primaires sont liées à l'histoire naturelle des affections considérées et sont comparables à celles observées en France (REIN 2004).

En outre, nous observons une corrélation négative ( $-0.90$ ,  $p=0.037$ ) entre la proportion de cas d'IRCT de cause inconnue et celle de cas associés à une NG sur les 5 périodes de 2 ans considérées, ce qui pourrait suggérer un effet de « vases communicant » entre diagnostic de NG et de cause indéterminée.

Les inter-relations entre absence ou insuffisance de suivi néphrologique, recours tardif à la prise en charge, âge du patient et difficulté à porter un diagnostic sont qualitatives et devraient être confirmées par des études spécifiques qui manquent à ce jour. En France, on observe une variabilité de 4 à 15% de la proportion des causes indéterminées parmi les cas incidents d'IRCT en fonction de la région de prise en charge en 2003 (REIN 2005). Ceci est probablement lié, en plus des questions d'accès aux soins pour ces personnes, y compris en termes d'accès aux examens complémentaires (biologiques, histologiques, radiologiques) nécessaires à l'identification de la pathologie primaire, aux pratiques locales de chaque néphrologue en cas de diagnostic de présomption (propension à se fier à son intuition en l'absence de possibilité de confirmation).

Cette « boîte noire » des causes incertaines, inconnues, indéterminées, et finalement idiopathiques (incertitude également sémantique...) présente de toute évidence un biais important dans l'étude de l'évolution des causes spécifiques d'IRCT telles que la NICI.

Ayant posé plus haut l'hypothèse du rôle de certains facteurs de risque environnementaux et alimentaires dans l'augmentation rapide de l'incidence des IRCT de cause NIC et indéterminées, nous recherchons par la suite d'éventuelles variations régionales dans la fréquence de survenue de ces affections.

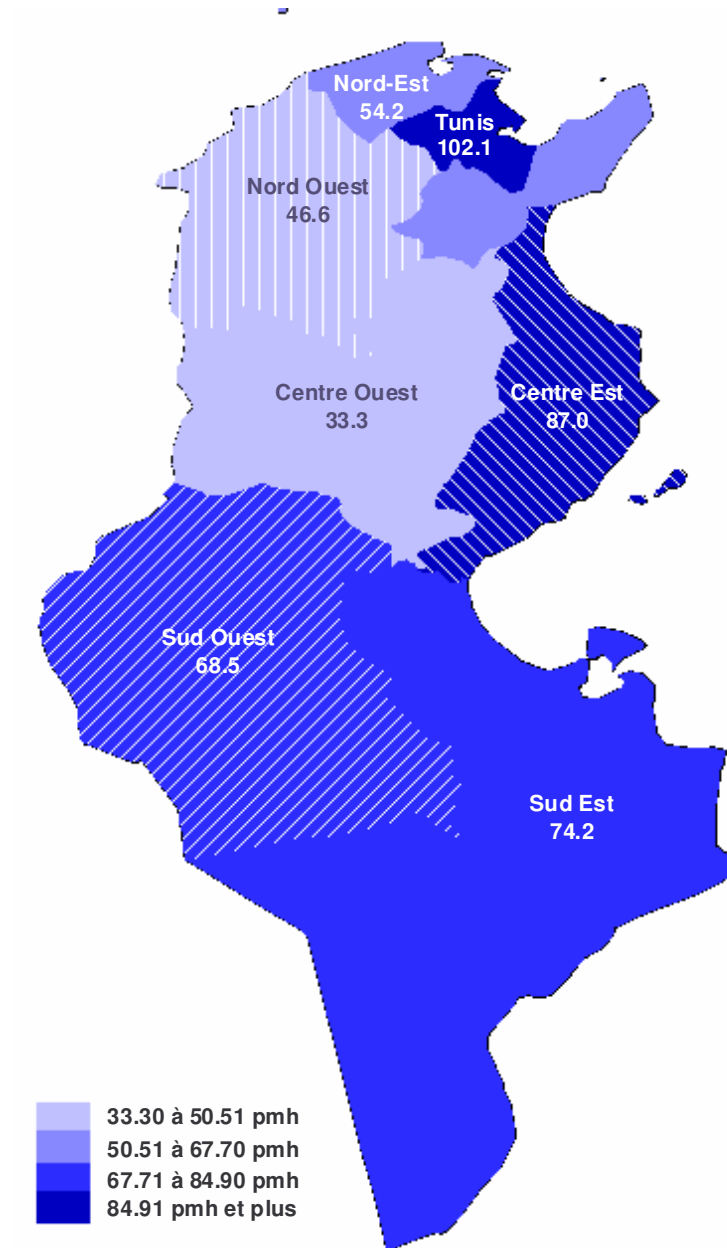
### III.3 Variations spatiales

#### III.3.1 Incidence globale par région

##### Taux d'incidence régionaux décennaux

La région attribuée au patient est celle où la prise en charge a été effectuée et ne tient donc pas compte des phénomènes de migration liés aux limitations de l'offre de places en hémodialyse dans certaines régions. Il ne nous est pas possible de déterminer quantitativement la proportion de cas concernés, mais à titre de comparaison, la proportion de nouveaux malades ne résidant pas dans la région de leur premier lieu de traitement variait entre 2 et 10% en France en 2002, et 1 à 7% des malades incidents ont débuté leur traitement dans une région différente de leur lieu de résidence (REIN 2004, résultats concernant quatre régions de France). Nous considérons que les données régionales dont nous disposons décrivent l'activité régionale de dialyse davantage que la force d'incidence de l'IRC terminale selon la région. Cette analyse nous renseigne donc essentiellement sur la capacité d'accueil et l'accès aux soins spécialisés dans chaque région.

Par suite, nous nommons « incidence du traitement de suppléance » ou « incidence de la prise en charge » les taux d'incidence régionaux d'IRCT dont les estimations décennales sont consignées à la figure 12.



**Figure 12:** Incidence du traitement de suppléance de l'IRC selon la région de prise en charge. 1992-2001, en cas par million d'habitants. Taux ajustés sur l'âge et le sexe. Population de référence : Tunisie 1992-2001. Les intervalles de confiance à 95% sont rapportés en Annexe 1.

Les disparités régionales d'activité de dialyse observées sur la période 1992-2001 sont considérables, l'incidence variant de 33.3 pmh dans la région Centre-Ouest à 102.1 dans le district de Tunis. Les taux étant ajustés sur l'âge et le genre, une différence d'accès au diagnostic de l'IRC et au traitement de suppléance est probablement à l'origine d'une grande part de la variabilité observée. Cet accès différentiel à la prise en charge de l'IRC terminale va de paire avec un accès inégal aux soins spécialisés et au système de santé en général, lié à un isolement géographique et/ou socio-économique, parfois accompagné de barrières culturelles dans le recours aux soins.

En France, par exemple, on observe une plus faible incidence en milieu rural par rapport au milieu urbain, qui ne semble pas pouvoir être entièrement expliquée par des différences de style de vie et de cartes sanitaires. La « dureté au mal » et l'absence d'une culture de recours à la médecine « moderne » pourraient, dans certains cas, être à l'origine d'un isolement sanitaire volontaire, comme le suggèrent les données des registres français et belge (Couchoud 2005, communication personnelle).

Skhiri et al. (2001) ont mis en évidence des inégalités de santé encore importantes aujourd'hui entre les 7 grandes régions tunisiennes, ce par la comparaison d'indicateurs tels que la mortalité infantile, le nombre d'habitants par médecin, le taux d'alphabétisme et les dépenses moyennes réalisées par personne et par an.

Nous observons en effet une nette corrélation entre l'incidence régionale de la prise en charge de l'IRC terminale et les indicateurs sanitaires, socio-économiques et humains, dont certains proposés par Skhiri et al. (2001) selon la classification OMS. Nous avons également calculé la proportion des cas incidents d'IRCT bénéficiant de l'Aide Médicale (partiellement) Gratuite (AMG) et avons observé une association fortement négative avec l'incidence de la prise en charge. Les coefficients de corrélation obtenus sont consignés au tableau 7.

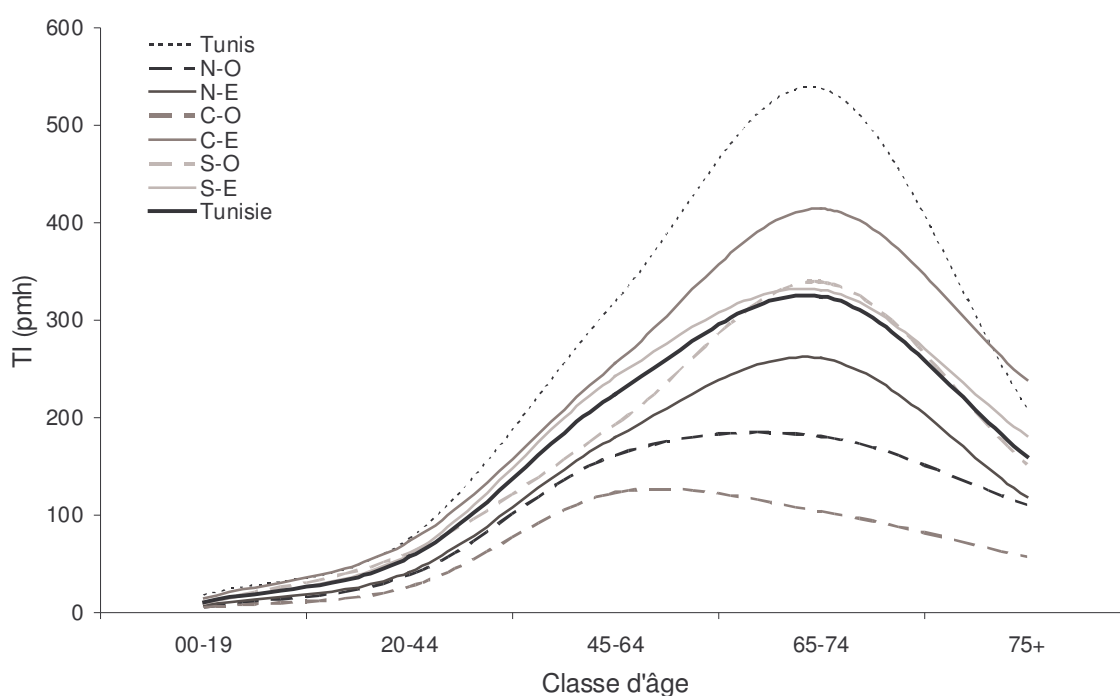
Indicateur	Corrélation	p
Mortalité infantile (‰)	-0.712	0.071
Nombre d'habitants par médecin	-0.88	0.009
Nombre de lits d'hôpital par 1000 habitants	0.71	0.074
Nombre d'habitants par centre de dialyse	-0.79	0.036
Alphabétisme (%)	0.88	0.009
Dépenses moyennes (DT/personne/an)	0.88	0.009
AMG (% des patients)	-0.77	0.072

**Tableau 7 :** Association entre indicateurs de santé et incidence régionale du traitement de suppléance de l'insuffisance rénale terminale. Coefficients de corrélation de Spearman et p associé au test de significativité.

Ainsi la faiblesse de l'incidence du traitement de suppléance observée dans les régions les plus défavorisées (N-O et S-O) par rapport à celle observée dans les régions « les mieux loties » (C-E et district de Tunis) serait-elle liée à des facteurs interdépendants intervenant de façon séquentielle : un moins bon accès aux soins spécialisés (facteurs géographiques, économiques, culturels) relié à une élévation de la force d'incidence des facteurs de risque compétitifs (décès d'une autre cause avant que l'IRC n'ait pu se développer et être diagnostiquée) et au décès d'un certain nombre de personnes des suites d'une urémie non diagnostiquée et encore moins prise en charge impliquant, complications et co-morbidités.

## Influence de l'âge et de l'accès aux soins

Les taux spécifiques par classe d'âge (figure 13 révèlent des incidences particulièrement basses chez les 65 ans et plus dans les régions N-O et C-O. Comme précisé plus haut à propos de la plus faible incidence décennale de l'IRCT chez les 75 ans et plus, Moulton et al. (1992) proposent quatre facteurs d'interprétation des disparités régionales chez les plus âgés : (1) une incidence véritablement moindre dans cette tranche d'âge ; (2) un accès encore limité aux soins spécialisés ; (3) une moindre prescription des traitements de suppléance liée à leur coût favorisant la prise en charge prioritaire des plus jeunes ; (4) le refus de traitement par EER chez les plus âgés, perçu comme lourd de conséquences en terme de qualité de vie.



**Figure 13:** Courbes d'incidence brute d'IRCT toutes causes.  
Par classe d'âge en fonction de la région de prise en charge.

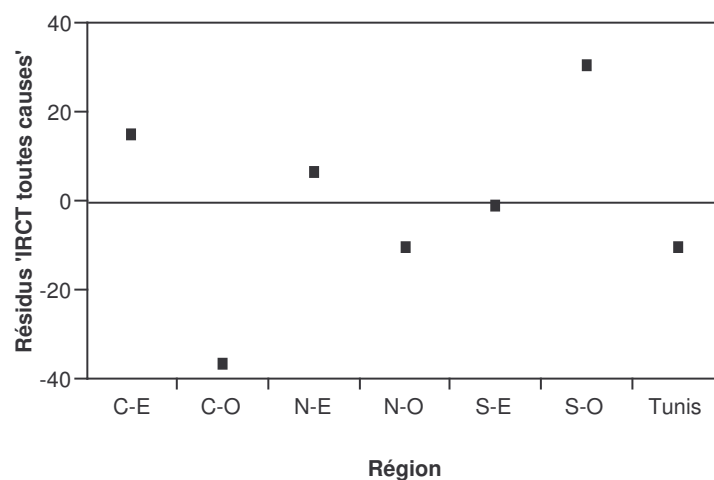
Le premier point (1) semble peu probable dans la mesure où l'insuffisance rénale est une affection liée au vieillissement (Lamb et al. 2003; Mulder and Hillen 2001a; Mulder and Hillen 2001b). Un processus de vieillissement normal, altérant la structure et les fonctions rénales, et une interaction entre pathologie et âge sont souvent évoqués (Fliser et al. 1997; Lindeman 1998), notamment en terme de comorbidité : hypertension, diabète et maladies cardio-vasculaires sont largement prévalentes chez les sujets âgés et fortement associées à la survenue de néphropathies chroniques (White et al. 2005).

La question de l'accès aux soins spécialisés (2) renvoie à la précarité économique des personnes âgées et à leur propension à avoir recours au système de santé, tel qu'évoquée plus haut à propos des disparités régionales, mais aussi à l'acceptabilité pour une personne âgée de se conformer à un traitement lourd, qui plus est hors domicile (4). À ce titre, la comparaison des taux dans la classe des 65 ans et plus à ceux prédits par une régression sur les taux des 45-64 ans tel que suggéré par Moulton et al. (1992) nous livre (figure 14) que les régions C-O et,

dans une moindre mesure, N-O présentent un déficit important de prise en charge de l'IRCT chez les plus âgés (résidus négatifs).

Le fait que le district de Tunis, qui est la région où l'incidence ajustée sur l'âge est la plus élevée de Tunisie, présente un déficit comparable à celui observé dans le N-O, pourrait s'expliquer par la chute de l'incidence observée chez les 75 ans et plus sans, que nous ayons d'éléments d'interprétation de cette faiblesse.

Enfin, le résidu positif observé dans la région Nord-Est où le taux d'incidence globale est relativement bas pourrait s'expliquer par un phénomène de migration des personnes plus jeunes vers le district de Tunis, où sont concentrés de nombreux centres d'hémodialyse, pour être pris en charge, alors que les plus âgés sont préférentiellement traités « sur place ».



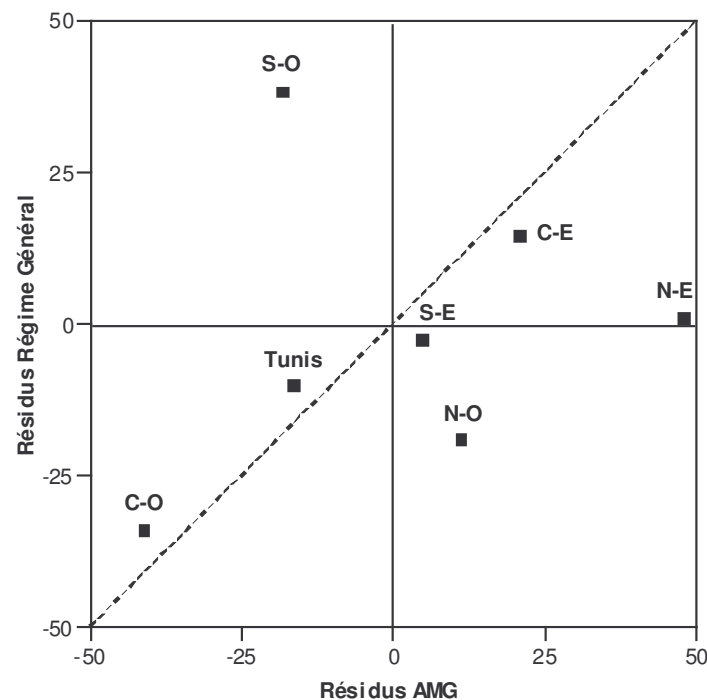
**Figure 14:** Incidence observée des cas d'IRCT chez les 65 ans et plus relativement à l'incidence attendue par région. Les résidus sont consignés :  $100 * (\text{observé} - \text{attendu}) / \text{attendu}$ . L'incidence attendue est obtenue par régression de type Poisson des taux des '65+' sur les taux des '45-64' ans (1992-2001). Les taux sont ajustés par classe d'âge et par sexe sur la population tunisienne (1992-2001).

Ces deux points et celui relatif à la prescription des traitements de suppléance (3) renvoient également à la couverture sociale des personnes atteintes d'IRC terminale, et en particulier au type d'affiliation à l'assurance maladie. Bien sûr les personnes totalement exclues du système de santé ne nous sont pas ici accessibles. Un récent rapport de l'association internationale de la sécurité sociale indique que si l'affiliation est quasi-pleine pour les deux régimes généraux (salariés des secteurs public et privé), une sous-affiliation caractérise les activités précaires, notamment les ouvriers agricoles, les pêcheurs, les gens de maison, les adhérents au régime des travailleurs non-salariés de l'artisanat et de l'agriculture, dont une partie seulement bénéficie de et a recours à l'aide médicale gratuite (Cherif and Essoussi 2004).

Nous nous proposons toutefois ici de distinguer l'incidence en fonction de l'affiliation, ce qui devrait déjà nous livrer quelques éléments de discussion, à supposer que les personnes bénéficiant de l'Aide Médicale (partiellement) Gratuite aient un profil d'occurrence différent en raison de facteurs de risque distaux (statut socio-économique en particulier) comme proximaux (expositions environnementales notamment), ce d'autant plus qu'ils sont âgés.

La figure 15 apporte les résidus obtenus chez deux groupes s'assurés sociaux : les personnes affiliées aux caisses nationales des salariés du privé et des fonctionnaires (CNSS et CNRPS) regroupées par commodité sous l'appellation « Régime général », et celles bénéficiant de l'AMG, donc en principe étant en situation de précarité économique mais bénéficiant de certains abattements de frais médicaux. Les résidus du graphique s'interprètent comme suit :

- Un résidu égal à zéro indique que le taux d'incidence régional chez les personnes âgées de 65 ans et plus relativement au taux observé chez les 45-64 ans (lesquels sont censés refléter au plus près l'incidence vraie de l'IRC terminale dans la population considérée) est égal à la moyenne estimée de toutes les incidences régionales chez les plus âgés pour le groupe d'assurés sociaux considéré ;
- Un résidu positif indique une incidence du traitement supérieure à celle attendue : moitié supérieure du graphique pour le « régime général » et moitié droite pour l'AMG ;
- Un résidu négatif signale un déficit de traitement dans la région et le groupe d'assurés considérés relativement à la moyenne nationale pour ce même groupe : moitié inférieure du graphique pour le « régime général » et moitié gauche pour l'AMG.
- Enfin, les régions se situant sur la diagonale ne présentent pas de différence notable d'occurrence du traitement de l'IRC terminale entre les deux régimes considérés chez les plus âgés.



**Figure 15:** Incidence observée des cas d'IRCT chez les 65 ans et plus relativement à l'incidence attendue en fonction du régime d'affiliation à la sécurité sociale par région de prise en charge. Les résidus sont consignés :  $100 \times (\text{observé} - \text{attendu}) / \text{attendu}$ . L'incidence attendue est obtenue par régression de type Poisson des taux des '65+' sur les taux des '45-64' ans (années 1992 à 2001). La diagonale représente l'égalité des incidences chez les plus âgés des deux groupes d'assurés relativement aux plus jeunes.

L'analyse de la figure 15 nous permet de distinguer :

1. Trois régions où il existe un différentiel de prise en charge des plus âgés entre « Régime Général » et AMG :
  - La région N-O pour laquelle le résidu est positif pour l'AMG et négatif pour le « Régime Général » ;
  - La région N-E pour laquelle le résidu est largement positif pour l'AMG et nul pour le « Régime Général » ;
  - La région S-O pour laquelle le résidu est négatif pour l'AMG et largement positif pour le « Régime Général ».
2. Trois régions où il n'existe pas de différentiel de prise en charge entre « Régime Général » et AMG mais un déficit ou un excès global d'accès au traitement des plus âgés :
  - les régions C-O et Tunis où un déficit global de prise en charge des plus âgés se manifeste quelque soit le type d'affiliation (régions C-O et Tunis tous deux sur la diagonale et à résidus négatifs pour l'AMG et le « Régime Général ») ;
  - la région C-E où on observe une plus forte prise en charge des plus âgés quelque soit le régime d'affiliation par rapport à la moyenne nationale.
3. Une région (S-E) où la prise en charge des personnes âgées avoisine la moyenne nationale pour les deux types de régime.

Ces résultats signalent d'ores et déjà l'existence de facteurs régionaux, notamment de type socio-économique, entrant en interaction avec l'âge dans la prise en charge de l'IRC terminale par traitement de suppléance. Pour aller plus loin dans cette analyse, il serait intéressant de disposer de données régionales concernant la mortalité liée au diabète, à l'hypertension artérielle et aux maladies cardio-vasculaires en général, c'est-à-dire aux facteurs de risque compétitifs qui peuvent expliquer un déficit dans l'enregistrement des cas d'IRC traitée et sont reliés en partie à l'accessibilité des soins (dépistage précoce, prévention, prise en charge lourde).

#### Incidence biannuelle par région

Le tableau 8 consigne les évolutions décennales de l'incidence du traitement de suppléance par région. Le classement relatif en 2000-01 est conservé par rapport à 1992-93 hormis le fait que la région Sud-Est a rattrapé la région Centre-Est avec un taux annuel de progression parmi les plus élevés (+9.5%). Les régions Nord-Ouest et Centre-Ouest restent en retrait, mais leur évolution sur la période considérée est la plus rapide de Tunisie (+10% par an), indiquant très probablement un rattrapage progressif du déficit de prise en charge. Enfin, les régions du district de Tunis et du Centre-Est sont celles où la progression a été la plus « lente » (respectivement +5.4 et +6.5% par an), partant des incidences les plus élevées.

Les variations régionales d'incidence du traitement par type de pathologie primaire sont rapidement abordées dans les paragraphes suivants.

Région de prise en charge	Taux d'Incidence <sup>a</sup> IRC traitée (pmh)					Évolution annuelle	
	1992-93	1994-95	1996-97	1998-99	2000-01	%	IC95%
N-O	25.4	18.8	39.8	66.5	66.1	10.0	[8.4 ; 11.7]
N-E	34.7	32.8	42.2	57.8	83.9	9.2	[7.3 ; 10.5]
C-O	17.7	22.7	28.1	41.4	47.0	10.0	[8.3 ; 12.3]
C-E	65.8	66.3	75.9	99.4	101.3	6.5	[6.0 ; 7.0]
S-O	36.9	48.4	60.6	81.9	88.9	9.2	[7.9 ; 10.4]
S-E	42.0	49.9	60.0	89.2	103.7	9.5	[8.3 ; 10.7]
Tunis	73.3	84.9	89.3	112.4	123.4	5.4	[4.8 ; 5.9]
Tunisie	46.4	50.4	60.2	81.7	90.9	7.1	[5.8 ; 8.4]

(a) Taux ajustés sur l'âge et le sexe, référence : population tunisienne 1992-93.

**Tableau 8** : Incidence biannuelle régionale du traitement de suppléance de l'insuffisance rénale terminale et % annuel de variation.

Taux ajustés sur l'âge et le sexe. Population de référence : Tunisie 1992-2001.

### III.3.2 Importance relative des pathologies primaires

En pratique hospitalière, les néphrologues interrogés ont observé une dichotomie entre ville et campagne au niveau du stade de dépistage de l'IRC et des pathologies primaires du rein. En effet, si en milieu urbain (régions de Tunis, Centre-Est et Sud-Est), l'étiologie peut généralement « facilement » être retrouvée et correspond majoritairement aux facteurs de risque bien connus que sont le diabète et l'hypertension artérielle, en milieu rural (régions Nord-Ouest, Centre-Ouest et Sud), les causes sont souvent difficiles à déterminer, les néphropathies d'origine infectieuse et autres types de néphropathies interstitielles sont plus fréquentes et le stade de dépistage de l'IRC est plus tardif. Ce caractère tardif peut être relié à l'évolution à bas bruit des NIC, sans manifestation clinique évidente jusqu'à ce que la NIC entraîne une IRC, et peut-être aussi par un rapport différent à la santé des populations urbaines et rurales, en particulier lorsque ces dernières se trouvent en situation de précarité.

Nos résultats concernant la prise en charge de l'IRC terminale confirment ces témoignages relatifs aux pathologies rénales chroniques en général.

#### Incidence par région

Le tableau 9 consigne les taux d'incidence du traitement de suppléance par région et par sexe pour trois catégories de pathologies primaires sur la période 1992-2001 : néphropathies interstitielles chroniques, NIC idiopathiques et causes indéterminées. Pour ne citer que les extrêmes, on observe une incidence faible des NIC, y compris les NICI, dans les régions Centre-Ouest (respectivement 3.5 et 2.4 pmh) et Nord-Ouest (respectivement 5.9 et 4.3 pmh) où l'incidence globale est la plus faible, et largement plus forte dans la région Centre-Est (respectivement 15.1 et 8.3 pmh). Les incidences observées dans la région Centre-Est sont en fait supérieures à celles des autres régions quelque soit la pathologie primaire hormis les cause indéterminées, et à l'exception du district de Tunis qui est largement en tête pour les affections de type néphropathies diabétiques et vasculaires, y compris hypertensives. Le Centre-Est regroupe notamment les gouvernorats de Monastir, Sousse et Sfax qui sont biens pourvus en soins spécialisés, et en particulier dotés de deux services hospitalo-universitaires de néphrologie. Il n'est donc pas exclu qu'un certain nombre de patients se déplace des gouvernorats du Centre-Ouest vers ceux de l'Est lorsqu'ils en ont les moyens (déménagements thérapeutiques évoqués plus haut), renforçant le déficit de prise en charge observé dans le C-O et que nous avons relié à un relatif isolement géographique et socio-

économique allant de paire avec des facteurs de risque compétitifs et, possiblement, une « culture hésitante » de recours aux soins.

Région	NIC				NICI				Indéterminée			
	H	F	Tous	SR	H	F	Tous	SR	H	F	Tous	SR
N-O	3,9	7,3	<b>5,9</b>	<i>0,53</i>	2,3	6,2	<b>4,3</b>	<i>0,37</i>	13,6	13,4	<b>13,5</b>	<i>1,01</i>
N-E	8,3	6,7	<b>7,7</b>	<i>1,24</i>	4,5	4,3	<b>4,4</b>	<i>1,05</i>	14,8	11,9	<b>13,3</b>	<i>1,24</i>
C-O	3,6	4,1	<b>3,5</b>	<i>0,88</i>	1,6	3,1	<b>2,4</b>	<i>0,52</i>	28,7	23,9	<b>26,3</b>	<i>1,20</i>
C-E	16,1	13,7	<b>15,1</b>	<i>1,18</i>	8,8	7,9	<b>8,3</b>	<i>1,11</i>	19,1	7,4	<b>13,2</b>	<i>2,58</i>
S-O	10,3	7,5	<b>8,3</b>	<i>1,37</i>	5,3	4,8	<b>5,1</b>	<i>1,10</i>	32,9	32,4	<b>32,6</b>	<i>1,02</i>
S-E	9,7	8,3	<b>8,5</b>	<i>1,17</i>	3,8	5,3	<b>4,6</b>	<i>0,72</i>	36,4	31,7	<b>34</b>	<i>1,15</i>
Tunis	10,2	9,4	<b>10,1</b>	<i>1,09</i>	4,8	6,4	<b>5,6</b>	<i>0,75</i>	18,3	17,7	<b>18</b>	<i>1,03</i>

**Tableau 9** : Incidence régionale du traitement de suppléance en fonction du sexe pour trois catégories de pathologie primaire. Taux ajustés sur l'âge (Hommes et Femmes) et le sexe (Tous).  
Référence : population tunisienne 1992-2001. SR : sexe-ratio.

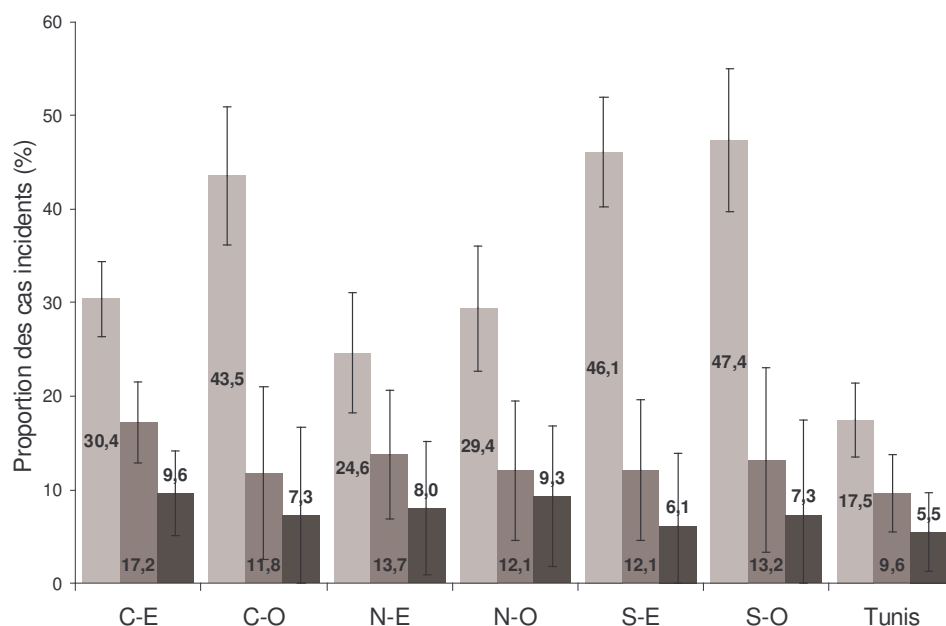
Nous remarquons enfin que c'est dans les régions N-O et C-O que le sexe-ratio est le plus bas pour les NIC et surtout pour les NICI (respectivement 0.37 et 0.52), renvoyant à la question d'un différentiel de mortalité entre hommes et femmes dans ces régions et à des profils de pathologies primaires interstitielles touchant plus fréquemment les femmes telles que la néphropathie aux analogés et une NIK de la NEB évoquées plus haut.

Au vu de ce différentiel global de prise en charge entre régions se répercutant au niveau de l'incidence respective des pathologies primaires, il nous semble plus opportun de compléter ce tableau par l'étude de la proportion des cas de cause NIC et NICI en fonction de la région de résidence (figure 16), ainsi que des rapports de chance (odds ratio) de survenue d'une cause relativement à toutes les causes dans une région donnée par rapport à l'ensemble de la population tunisienne (tableau 11).

#### Proportion des cas de NIC et NICI

Les proportions de NIC et de NICI sont les plus élevées dans la région Centre-Est (respectivement 17.2 et 9.6% des cas d'IRC traitée), et les plus basses dans le district Tunis (respectivement 9.6 et 5.5%). La région Nord-Ouest se distingue par une proportion importante de NICI parmi les nouveaux cas (9.3%), tandis que les régions Centre-Ouest, Sud-Est et Sud-Ouest recensent environ 50% de causes indéterminées, rendant l'interprétation des taux spécifiques par pathologie primaire des plus périlleuses.

Trois tendances intéressantes se dessinent à partir des résultats du tableau 11 : augmentation significative des chances de diagnostic de type NIC et NICI dans la région Centre-Est à opposer à une diminution significative dans le district de Tunis ; odds-ratio très supérieur à un pour les causes indéterminées dans les régions Sud-Ouest, Sud-Est et Centre-Ouest et très inférieur à un dans le district de Tunis ; et enfin augmentation à la limite de la significativité des chances de diagnostic de type NICI dans la région Nord-Ouest.



**Figure 16** : Proportion de cas incidents d'IRCT (et IC95%) par rapport au total en fonction de la région de prise en charge (1992-2001) - Cause inconnue (Gris clair), NIC (Gris foncé) et NICI (Noir).

Région	NIC		NICI		Indéterminée	
	OR	IC95%	OR	IC95%	OR	IC95%
N-O	0.93	[0.72 ; 1.20]	1.26	[0.95 ; 1.69]	1.03	[0.86 ; 1.24]
N-E	1.08	[0.86 ; 1.35]	1.07	[0.81 ; 1.43]	0.81	[0.68 ; 0.97]
C-O	0.90	[0.66 ; 1.23]	0.96	[0.65 ; 1.42]	1.91	[1.55 ; 2.34]
C-E	1.41	[1.22 ; 1.63]	1.31	[1.09 ; 1.58]	1.08	[0.96 ; 1.22]
S-O	1.03	[0.74 ; 1.41]	0.97	[0.64 ; 1.48]	2.23	[1.79 ; 2.78]
S-E	0.93	[0.72 ; 1.20]	0.81	[0.57 ; 1.14]	2.12	[1.79 ; 2.51]
Tunis	0.72	[0.61 ; 0.85]	0.72	[0.58 ; 0.89]	0.53	[0.46 ; 0.60]

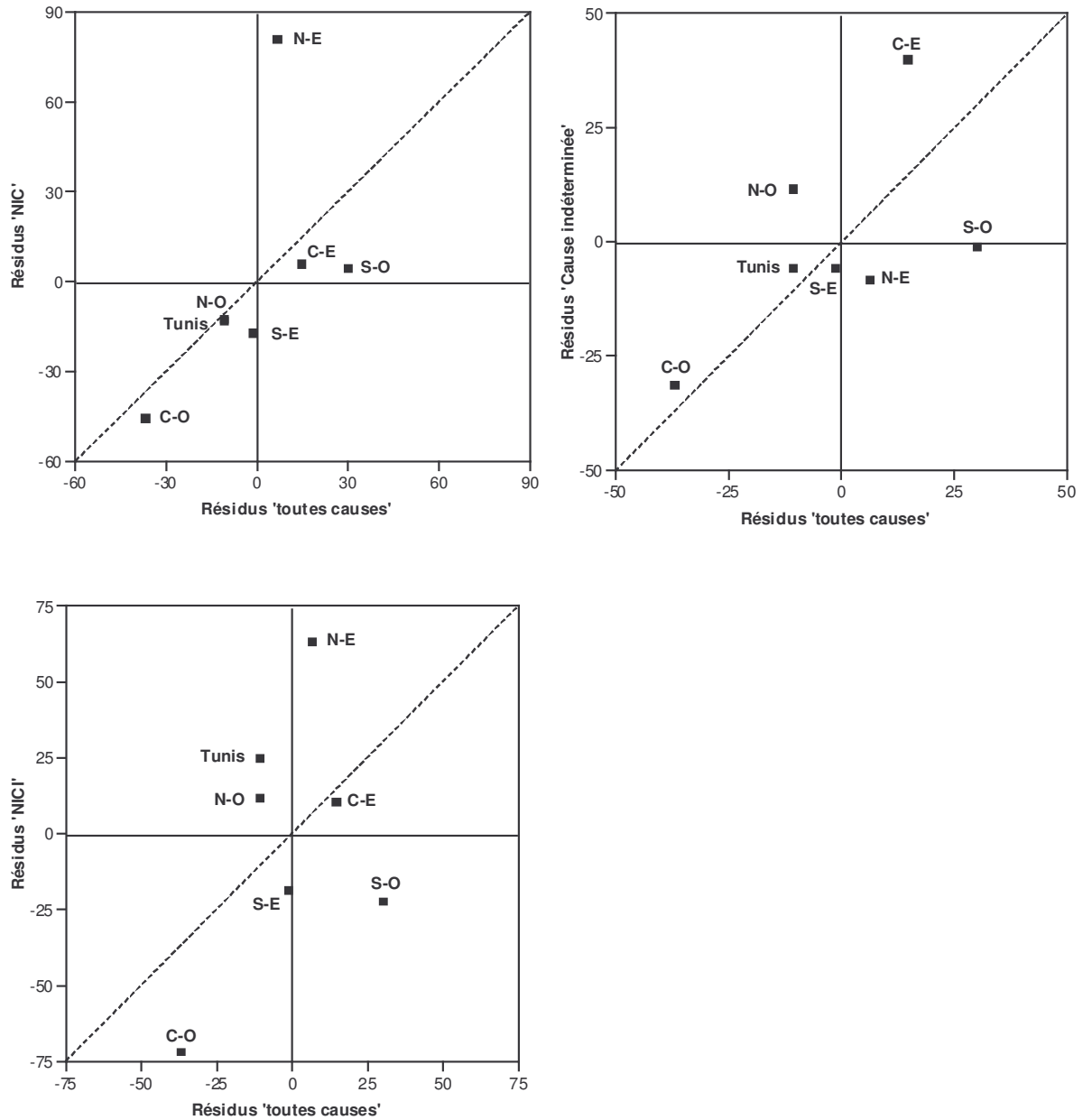
**Tableau 11** : Odds-Ratio de la proportion de nouveaux cas présentant la pathologie primaire indiquée par rapport à la proportion dans l'ensemble de la population tunisienne et IC95%.

Dans le district de Tunis, la présence de médecins néphrologues de niveau universitaire et l'infrastructure d'investigation clinique y afférente contribuent probablement à la moindre proportion des cas d'IRC terminale de cause indéterminée. L'absence d'un tel constat dans la région Centre-Est, pourtant bien pourvue en compétences néphrologiques, pourrait tenir à des pratiques différentielles de diagnostic et/ou à un profil de patients particulier, notamment en termes de prise en charge tardive éventuellement liée à des migrations sanitaires de l'Ouest vers l'Est.

En effet, on observe dans la région Centre-Est des odds-ratio inférieurs à un pour les pathologies primaires de type néphropathies diabétiques et vasculaires-HTA (à l'opposé des odds-ratio largement supérieurs à un observés dans le district de Tunis pour ces deux groupes) suggérant qu'à la « clientèle urbaine » de la population résident véritablement dans le Centre-Est vient s'ajouter un « public rural », notamment venant des gouvernorats du Centre-Ouest, présentant probablement des profils de pathologies primaires distincts : NIC, dont NICI, et NG.

### Relation entre pathologie primaire, région et âge du patient

Ayant mis en évidence un déficit de prise en charge de l'IRC terminale toutes causes confondues (cf. figure 14) chez les plus âgés dans certaines régions, nous recherchons enfin des différentiels de déficit en fonction de la pathologie primaire. L'approche adoptée est semblable à celle décrite en III.3.1 et les résultats rapportés aux figures 17a à 17c.



**Figure 17 :** Incidence observée de la prise en charge de l'IRCT chez les 65 ans et plus relativement à l'incidence attendue en fonction de la pathologie primaire par région de prise en charge. Les résidus sont consignés :  $100 \times (\text{observé} - \text{attendu}) / \text{attendu}$ . L'incidence attendue est obtenue par régression de type Poisson des taux des '65+' sur les taux des '45-64' ans (années 1992 à 2001). Les taux sont ajustés par classe d'âge et par sexe sur la population tunisienne (1992-2001). (a) : NIC versus toutes causes ; (b) : NICI versus toutes causes ; (c) : Cause indéterminée versus toutes causes.

Quatre régions sur sept (C-O, N-O, Tunis et C-E) ne présentent pas de différence notable de prise en charge des plus âgés entre diagnostics « NIC » et « toutes causes confondues » (figure 17a), alors que pour les « NICI » (figure 17b) et les « causes indéterminées » (figure 17c) respectivement une (C-E) et trois régions (C-O, Tunis et S-E) se trouve sur la diagonale. Dans le cas des NIC et des NICI, la région N-E se distingue par un résidu largement positif. La région N-O présente quant à elle des résidus positifs pour les NICI et les causes indéterminées qui contrastent avec le résidu négatif observé pour toutes les causes.

Si ces données sont difficiles à interpréter dans le détail, elles illustrent en tous cas de larges différences régionales d'accès aux soins (distance géographique aux infrastructures de santé mais aussi barrière financière), d'acceptabilité du traitement par EER, de pratiques dans la décision de prise en charge et/ou de mortalité par des causes compétitives chez les personnes âgées de 65 ans et plus, ce en fonction du profil de pathologie primaire qui est possiblement lié à des styles de vie différents, notamment entre urbains et ruraux. Ceci est d'autant plus probable dans le contexte de la transition épidémiologique qui caractérise la situation sanitaire de la population tunisienne.

## IV CONCLUSIONS

### IV.1.1 Une transition épidémiologique visible au niveau rénal

Le profil décennal d'incidence de l'IRCT en Tunisie évoque une situation de transition épidémiologique, c'est-à-dire d'une modification de l'importance relative des facteurs de risque et de la force d'incidence des maladies infectieuses et chroniques accompagnant le changement des modes de vie dans les pays en développement, caractérisée notamment par une augmentation forte de la prévalence de l'obésité, du diabète de type 2, de l'hypercholestérolémie et de l'hypertension artérielle. Or avec l'âge, le sexe, le tabagisme et des facteurs génétiques, ces affections comptent parmi les facteurs de risque connus les plus importants dans la survenue d'une pathologie rénale chronique (White et al. 2005).

Ainsi en Tunisie coexistent aujourd'hui des facteurs de risque de type infectieux, comme en témoigne l'importance des glomérulonéphrites dans certaines régions à caractère rural (N-O en particulier,  $OR_{NG}=1.64$  [1.33 ; 2.03]), et ceux correspondant à une occidentalisation des modes de vie, pour l'instant plus marquée en milieu urbain, d'où l'importance des étiologies diabétiques et vasculaires (dont liées à une HTA), dans le district de Tunis notamment ( $OR_{Ndiabétique}=1.42$  [1.26 ; 1.60] ;  $OR_{NV}=1.55$  [1.37 ; 1.75]).

Les néphropathies interstitielles chroniques occupent une place plus importante que dans la plupart des pays développés, mais moindre que dans bien des pays en développement, évoquant un recul possible des étiologies infectieuses au profit des origines toxiques. Plus de la moitié sont de cause indéterminée, et dans ce groupe seulement le sexe-ratio est inférieur à un, particulièrement bas chez les 45-64 ans, évoquant le profil d'occurrence de la néphropathie aux analgésiques et/ou d'une néphropathie interstitielle idiopathique présentant certaines similitudes avec la NEB, en particulier dans la région N-O (sexe-ratio de 0.37), et ce même chez les plus âgés (résidus positifs).

Entre 1992 et 2001, l'incidence globale de l'IRCT dans la population tunisienne a plus que doublé (+8.6% par an) et atteint des niveaux supérieurs à ceux observés en Europe (167 pmh). L'incidence est pourtant susceptible d'être sous-estimée en raison des inégalités persistantes d'accès aux soins observées entre régions, chez les plus âgés notamment, ou encore chez les

femmes et les personnes en situation de précarité. Les régions pour lesquelles un déficit de prise en charge est manifeste sont à prédominance rurale (N-O et C-O). On constate une progression rapide de l'incidence dans ces deux régions par rapport à celles où l'incidence était déjà la plus forte au début des années 90, indiquant une relative amélioration de la prise en charge et/ou une diminution de la force d'incidence des facteurs de risque compétitifs ou de co-morbidité et des complications de l'IRC, recul lié à un meilleur accès aux soins spécialisés. Toutefois, il est probable qu'un certain nombre de patients résidant dans l'Ouest rural ait migré vers l'Est urbain pour y être pris en charge par EER, faisant gonfler les taux d'incidence observés dans la région C-E notamment. Ceci est d'autant plus probable que le profil de pathologies primaires observé dans cette région est « mixte ».

Conformément à la tendance internationale, les néphropathies diabétiques ont progressé remarquablement vite (+14.5% par an) au cours de la décennie 90, suivies par les néphropathies interstitielles chroniques (+9.5%), dont les NICI (+7.4%), ce qui constitue une originalité par rapport aux pays développés. Les néphropathies vasculaires et liées à une HTA ont progressé moins rapidement (+5.8%), tandis que les néphropathies glomérulaires et les poly-kystoses rénales sont restées presque stables sur la période.

#### IV.1.2 La prédominance des causes indéterminées

Les IRCT de cause indéterminée ont largement contribué à l'augmentation de l'incidence globale sur la période (+11.1% par an). Ceci est à mettre en relation avec :

- un accès parfois encore tardif au diagnostic de l'IRC terminale et au traitement de suppléance, comme en atteste leur importance relative dans des régions telles que le C-O ;
- des profils de pathologies primaires particulièrement difficiles à diagnostiquer du fait de leur évolution à bas bruit jusqu'à des stades avancés et du caractère histologique de leur définition nosologique, impliquant une confirmation par biopsie rénale rarement possible (moins de 5% des cas, alors que près de 25% des cas sont définis comme « glomérulaires » et « interstitiels » en Tunisie) ;
- des pratiques de diagnostic locales et même individuelles reflétant la confiance placée par le néphrologue dans les diagnostics d'« élimination-intuition-présomption » qui caractérisent les NIC et plus particulièrement les NICI, ou encore les incertitudes quant au diagnostic peu spécifique des néphropathies liées à une HTA.

L'importance des causes indéterminées rend toute analyse de la force d'incidence par pathologie primaire à l'IRC terminale biaisée. De plus l'accès aux soins et la force d'incidence des facteurs de risque compétitifs demeurent inégaux entre régions. Les variations géographiques observées sont donc davantage un miroir de l'incidence du traitement de suppléance qu'un reflet fidèle de la fréquence de l'insuffisance rénale terminale dans les populations considérées.

#### IV.1.3 Des observations à relier à la problématique OTA

En dépit des limitations évoquées plus haut ainsi qu'en introduction, nous notons certains particularismes qui nous semblent intéressants, quoique nécessitant confirmation, dans le cadre de la problématique ochratoxine A. Nous nous proposons donc, pour clore cette partie, de les replacer dans le cadre d'une discussion subjective : rappel des faits, énonciation des opinions...

##### Les faits

Au niveau décennal, nous observons l'importance des NICI parmi les causes NIC et les cas d'IRCT en général, importance plus marquée chez les femmes que chez les hommes. Le sexe

ratio pour la NICI est d'ailleurs très bas chez les 45-64 ans, évoquant certains profils de pathologie primaire de type toxique tels que la NEB et dans le cas présent, la NIKI décrite en introduction comme pouvant être reliée à une exposition chronique à l'OTA.

En termes d'évolution temporelle, nous notons de plus un doublement de l'IRC terminale de cause NIC, et en particulier NICI, entre 1992 et 2001 dans la population tunisienne, qui n'a pas été observé dans la plupart des pays d'Europe.

Au niveau des variations régionales, nous relevons en particulier un sexe ratio pour la NICI très inférieur à un dans la région N-O, pour laquelle en dépit d'un déficit global de prise en charge mis en évidence chez les plus âgés, l'odds-ratio est supérieur à un (à la limite de la significativité) et le résidu est positif chez les personnes âgées de 65 ans et plus. Les odds-ratio positifs pour la NIC et la NICI relevés dans la région C-E semblent pouvoir provenir au moins en partie de la prise en charge de personnes originaires du C-O où l'accès aux soins spécialisés demeure limité.

Enfin, l'impressionnante progression de l'IRCT de cause indéterminée pourrait s'expliquer en partie par celle des pathologies primaires évoluant à bas bruit, en particulier certaines NIC dont la NIKI décrite en introduction.

#### Les opinions

Nous postulons que les cas d'IRCT de cause NICI recensés sur cette période de 10 ans dans la population tunisienne pourraient en partie être attribuables à une exposition régulière et élevée à l'OTA, sans que nous puissions trancher entre facteur d'initiation et de progression de cette pathologie rénale chronique.

Nous limitons toutefois nos extrapolations à certains groupes de populations susceptibles d'être ou d'avoir été fortement exposés à l'OTA et de réunir d'autres facteurs de risque, faisant de la NIKI une pathologie du « désavantage » .

Ces populations, essentiellement rurales (issues du N-O ou du C-O et s'étant parfois déplacées vers le C-E pour la prise en charge), cumuleraient un certain nombre de facteurs de risque proximaux, dont une exposition chronique et élevée à l'OTA et possiblement à d'autres mycotoxines telles que la citrinine ne serait que l'une des composantes.

La progression observée (doublement de l'incidence des IRCT-NICI en 10 ans) pourrait en grande partie s'expliquer par une amélioration de la prise en charge de l'IRC et des facteurs de risque compétitifs. De plus, un grand nombre de cas est vraisemblablement encore aujourd'hui classé parmi les causes inconnues, ou décède d'une complication avant d'avoir atteint le système de santé.

Aucun élément permettant d'apprécier le délai entre exposition et initiation de la pathologie n'est en notre possession, mais il est probable qu'il se compte en dizaines d'années, au cours desquelles l'exposition à l'OTA est susceptible d'avoir changé (Perneger and al. 1995a). Les personnes recensées ici se trouvant de plus à des stades très avancés d'IRC, nous postulons que les cas possiblement liés à l'OTA renvoient de toute façon à une exposition ancienne ne préjugant pas de la situation actuelle en Tunisie.

Enfin, nous pensons qu'il n'est pas exclu que l'OTA soit un facteur de progression pour d'autres pathologies rénales, notamment celles de cause diabétique en forte augmentation. Cette hypothèse, soulevée par Hsieh et al. (2004), nécessite pour être testée la mise en place d'études spécifiques.

## CHAPITRE 2:

### MODELISATION DE L'EXPOSITION ALIMENTAIRE A L'OCHRATOXINE A DANS LA POPULATION FRANÇAISE

« Nous pourrions placer ici un très joli problème d'ordre général :  
À quel point l'observation est vraie ?  
À quel point le modèle est faux ?  
À quel point le modèle est vrai ?  
À quel point l'observation est fausse ? »

Anonyme Dada  
Après *Mouchoir de Nuage*, Tristan Tzara.

# INTRODUCTION: LA MODELISATION DES EXPOSITIONS ALIMENTAIRES

En guise de prologue	77
L'évaluation des expositions alimentaires : cadre général	77
Le choix du modèle	80
La variabilité des niveaux de contamination (Partie 1)	81
La variabilité des ingérés alimentaires (Partie 2)	82

## PARTIE 1: HANDLING OF CONTAMINATION VARIABILITY IN EXPOSURE ASSESSMENT: A CASE STUDY WITH OCHRATOXIN A.

<b>I INTRODUCTION AND OBJECTIVES</b>	<b>84</b>
<b>I.1 Variability of contamination of foods over space and time</b>	<b>84</b>
<b>I.2 Handling of input variability through probabilistic exposure modelling</b>	<b>84</b>
<b>I.3 Separating variability from uncertainty in output</b>	<b>85</b>
<b>I.4 Research objectives</b>	<b>86</b>
<b>II MATERIALS AND METHODS</b>	<b>87</b>
<b>II.1 Input data description</b>	<b>87</b>
II.1.1 Contamination data	87
II.1.2 Consumption data	87
<b>II.2 Exposure modelling</b>	<b>89</b>
II.2.1 General exposure model	89
II.2.2 Probabilistic approach	89
Time-window for the fluctuation of contamination levels (W, D and O)	89
Distributions development for Monte-Carlo simulations	90
Monte-Carlo simulations	92
Estimation of between-persons distribution parameters and 95%CI	92
II.2.3 Estimation and plotting of exposure distributions	93
<b>III RESULTS</b>	<b>93</b>
<b>III.1 Variability of exposure estimates</b>	<b>93</b>
III.1.1 Non-parametric <i>versus</i> parametric CDFs	93
III.1.2 'Week' <i>versus</i> 'Occasion' as time-window	95
<b>III.2 Uncertainty of parameters estimates</b>	<b>95</b>
III.2.1 Non-parametric <i>versus</i> parametric CDFs	95
III.2.2 'Week' <i>versus</i> 'Occasion' as time-window	97
<b>IV DISCUSSION</b>	<b>97</b>
<b>IV.1 Parametric or non-parametric CDFs</b>	<b>97</b>
<b>IV.2 Time window for contamination sampling in probabilistic modelling</b>	<b>99</b>

<b>IV.3</b>	<b>Input data validity</b>	<b>101</b>
IV.3.1	Consumption data	101
IV.3.2	Contamination data	102
<b>IV.4</b>	<b>Model validity</b>	<b>102</b>
<b>IV.5</b>	<b>Comparing output distributions to tolerable daily intakes</b>	<b>103</b>
<b>V</b>	<b>CONCLUSIONS</b>	<b>103</b>

## PARTIE 2: FITNESS-FOR-PURPOSE OF DIETARY SURVEY DURATION: A CASE-STUDY WITH THE ASSESSMENT OF EXPOSURE TO OCHRATOXIN A.

<b>I</b>	<b>INTRODUCTION AND OBJECTIVES</b>	<b>105</b>
I.1	Survey duration as fitting study goals	105
I.2	Lack of transposition from nutrient to non-nutrient intakes	105
<b>II</b>	<b>MATERIALS AND METHODS</b>	<b>106</b>
<b>II.1</b>	<b>Input data description</b>	<b>106</b>
II.1.1	Contamination data	106
II.1.2	Consumption data	106
<b>II.2</b>	<b>Exposure modelling</b>	<b>106</b>
II.2.1	General exposure model	106
II.2.2	Deterministic exposure model	106
II.2.3	Data transformation, variance decomposition and variance reduction	107
II.2.4	Estimation of number of days as a function of desired correlation or precision	108
II.2.5	Probabilistic approach	109
	Probabilistic exposure model	109
	Simulation of contamination variability with three and seven days of food records	110
	Agreement between classifications of individuals into quartiles of exposure	110
<b>III</b>	<b>RESULTS</b>	<b>110</b>
<b>III.1</b>	<b>Distribution of exposures to Ochratoxin A in the general population</b>	<b>110</b>
III.1.1	1, 3 and 7 days of food records	110
III.1.2	Correction of individual mean exposures for within-person variance	111
<b>III.2</b>	<b>Classification of individuals into quantiles of exposure</b>	<b>112</b>
III.2.1	Number of days to get a r correlation between observed and true OTA intakes	112
III.2.2	Exposure classification with three or seven days in a MCS design	113
<b>III.3</b>	<b>Assessment of individual intakes</b>	<b>113</b>
<b>IV</b>	<b>DISCUSSION</b>	<b>114</b>
<b>IV.1</b>	<b>Characterizing the distribution of exposures in a population</b>	<b>114</b>

<b>IV.2</b>	<b>Estimating individual intakes</b>	<b>115</b>
<b>IV.3</b>	<b>Input data validity</b>	<b>115</b>
IV.3.1	Use of heterogeneous ('non-standardized') contamination data	115
IV.3.2	Exclusion of low energy reporters from the study sample	116
IV.3.3	Available number of days of food record	116
IV.3.4	Linking of food items (consumption) with food groups (contamination)	117
<b>V</b>	<b>CONCLUSIONS</b>	<b>117</b>

## CONCLUSION: INDIVIDUS ET POPULATIONS

<b>I</b>	<b>EXPOSITION DE LA POPULATION : LE MAILLON FORT</b>	<b>118</b>
<b>I.1</b>	<b>Le cas de l'OTA</b>	<b>118</b>
I.1.1	Variabilité de la contamination	118
I.1.2	Variabilité des ingérés alimentaires	118
<b>I.2</b>	<b>Un point de vue plus général</b>	<b>118</b>
<b>I.3</b>	<b>Garder contact avec la réalité...</b>	<b>120</b>
<b>II</b>	<b>EXPOSITION INDIVIDUELLE : LE MAILLON FAIBLE</b>	<b>120</b>
<b>II.1</b>	<b>Le cas de l'OTA</b>	<b>120</b>
<b>II.2</b>	<b>Un point de vue plus général</b>	<b>120</b>
<b>III</b>	<b>L'APPORT DES MARQUEURS BIOLOGIQUES</b>	<b>121</b>

# INTRODUCTION:

## LA MODELISATION DES EXPOSITIONS ALIMENTAIRES

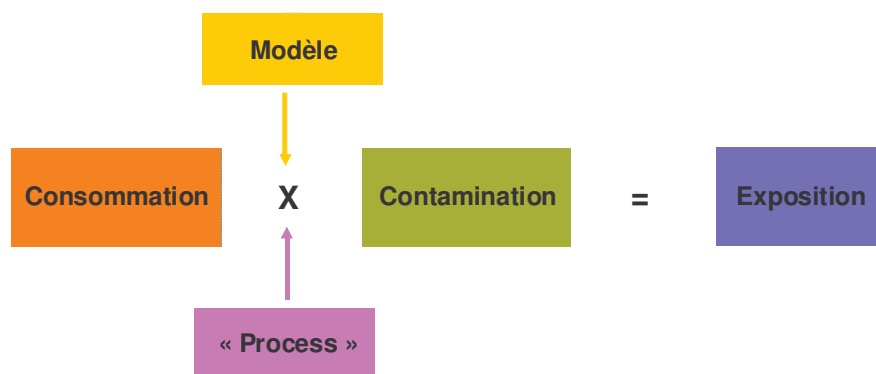
En guise de prologue

« Un rêve d'extériorité hante les usages des statistiques, tant dans les sciences sociales que dans le débat public : les faits sont les faits, les banques de données en recèlent les secrets. La magie de l'alchimie statistique est résumée par la transformation de ces deux mots, "faits" et "données", de participes passés en substantifs oublieux des verbes actifs qui les ont engendrés. Le "fait" symbolise le réel têtus, opposé aux idées vagues, aux fantasmes, aux théories fumeuses. Mais qui l'a fait ? Miracle de la langue qui conserve, comme la lettre volée bien en évidence et pourtant invisible d'Edgar Poe, la trace de la fabrication antérieure du "fait". Il est possible d'ouvrir les yeux : avant de devenir têtus, les faits ont été faits. Mais pas de faits sans données. Merveille de la technique moderne : il suffit d'une carte bleue, ou plutôt d'un accès à Internet, pour retirer des données à la banque. Mais qui les a données ? Données vraiment ? N'ont elles rien coûté ? Ne sont elles pas commercialisées, parfois fort chères ? Les réseaux sociaux et politiques d'enregistrement, de mise en forme et de calcul de ces données sont, eux aussi, escamotés par le passage du participe passé au substantif. Dès lors, les faits et les données circulent, à la fois construits et réels, d'autant plus réels qu'ils sont plus construits. Ils font les points d'appui, les preuves, les arguments. La société n'est pas un rêve. Elle n'a pas d'extérieur. Sont co-construites simultanément des façons de se représenter le monde, d'agir sur lui, de le mesurer et de modéliser. Les statistiques ne se contentent pas de " refléter la réalité ", elles contribuent à la créer, à travers le langage commun qu'elles proposent. Mais cette façon de les envisager se heurte à une irrésistible demande sociale de réalité " extérieure au débat ". Comment penser cette contradiction et la remettre dans le débat public ? »

Alain DESROSIÈRES: *Statistique et espace public, le rêve de l'extériorité.*

L'évaluation des expositions alimentaires : cadre général

L'évaluation de l'exposition humaine par voie alimentaire à un toxique « environnemental » ou « naturel » nécessite le plus souvent un certain niveau de modélisation. Le modèle élaboré doit permettre de combiner des données hétérogènes par le biais d'une construction mathématique plus ou moins complexe destinée à décrire la réalité, voire à la prédire. La figure 1 schématise l'opération de combinaison des données « source » opérée par le modèle pour produire une estimation de l'exposition considérée.



**Figure 1:** Des données « source » aux estimations : le modèle

## La modélisation de l'exposition : données « source »

Dans le cas des expositions alimentaires, y compris nutritionnelles, la modélisation est invoquée dans le but de reconstituer une information complète à partir d'informations parcellaires. En effet, les données « source » (les « input » : consommation par kilogramme de poids corporel et contamination par kilogramme d'aliment) dont on dispose pour estimer les expositions sont de qualité variable. Elles ne reflètent que partiellement la réalité de la variabilité de la grandeur « mesurée » (variabilité des prévalences et des niveaux de contamination, variabilité inter-individuelle et intra-individuelle des ingérés alimentaires, aussi bien en termes quantitatifs que de composition qualitative de la diète), ce qui renvoie aux problèmes de l'échantillonnage (taille et représentativité du groupe par rapport à la population d'étude). Elles présentent par ailleurs des degrés divers d'incertitude engendrée par les biais inhérents à l'échantillonnage (biais de sélection dans le choix des unités statistiques à enquêter en présence de forte hétérogénéité des lots de céréales, par exemple, ou d'une variabilité saisonnière, géographique et relative à d'autres facteurs sociodémographiques des consommations alimentaires individuelles), aux mesures analytiques (performances d'une méthode de dosage en fonction de la matrice considérée notamment) et aux informations issues d'une auto-évaluation (biais de mémoire, sous-déclaration des quantités consommées comprenant l'omission de certains aliments pour cause d'« indésirabilité sociale » de leur consommation).

Les tableaux 1 et 2 recensent un certain nombre de facteurs de variabilité et d'incertitude reliés aux données « source » qui servent d'« input » dans les modèles d'exposition alimentaire.

Données de consommation		Données de contamination
Variabilité intra-individuelle	Variabilité inter-individuelle	
Âge, situation « matrimoniale »	Âge, génération, sexe	Saison, Année (conditions climatiques)
Saison, Jour de la semaine	Niveau d'éducation	Stockage, transformation (industriels/domestiques)
Circonstances (restauration hors foyer, vacances)	Catégorie socioprofessionnelle Région de résidence	Origine géographique dont : variété ou espèce pratiques agricoles ou d'élevage écologie et climat
Nombre de jours d'enquête		

**Tableau 1:** Quelques facteurs de variabilité des données « source »

Données de consommation	Données de contamination
Méthode (QFA, rappel de 24h, carnet alimentaire)	Conversion des aliments bruts en « tels que consommés »
Séquence (jours consécutifs) d'enquête	
Erreur de déclaration des ingérés (mémoire, sous-déclaration)	Plan d'échantillonnage et sa mise en œuvre
Erreur d'enregistrement des données (codification, saisie)	Performances analytiques

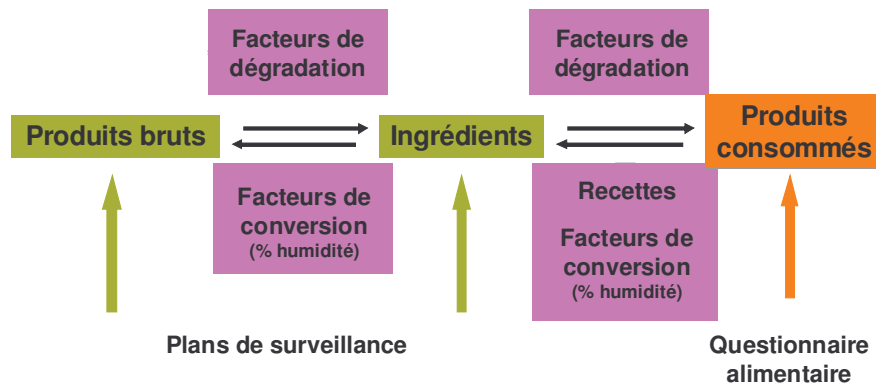
QFA : questionnaire de fréquence des consommations alimentaires

**Tableau 2:** Quelques facteurs d'incertitude des données « source »

Pour ne citer que quelques exemples, on sait que la consommation de certains aliments, tels que le vin et d'autres alcools, est quasi-systématiquement sous-déclarée dans la population générale. Dans le cas où l'aliment est un vecteur important de la toxine étudiée, il s'en suit

une sous-estimation globale de l'exposition, doublée d'un biais différentiel si l'ampleur de la sous-déclaration est corrélée aux quantités consommées.

Par ailleurs, comme illustré par la figure 2, il existe très souvent un problème de correspondance des nomenclatures entre données de contamination, la plupart du temps obtenues sur des produits bruts ou semi transformés (ingrédients tels que la farine de blé) et les données de consommation individuelle consistant en un relevé des produits « tels que consommé », c'est-à-dire de plats préparés et aliments cuisinés.



**Figure 2:** La conversion des aliments bruts en aliments « tels que consommés ».

Il est donc nécessaire d'établir une correspondance entre ces deux types d'information, sous peine de sous- ou de surestimer les niveaux d'exposition. Comme en épidémiologie et surveillance nutritionnelle, en fonction du soin apporté à la mise au point de recettes, facteurs de conversion et autres facteurs de « process » permettant de convertir les quantités ingérées par les personnes enquêtées en quantités de matières premières pour lesquelles les données de contamination (composition nutritionnelle) sont le plus souvent disponibles, l'exposition estimée variera également considérablement.

Sans que le détail de nos travaux soit donné ici, nous avons élaboré, à partir de la base RECIPE de la nomenclature INCA (base de données individuelles de consommation alimentaire mise en place par l'AFSSA ; Calamassi-Tran G. (2004)) une base de 276 « recettes » comportant des facteurs de conversion des items individuels correspondant aux aliments vecteurs d'OTA « tels que consommés » en aliments et ingrédients de base. Les sources que nous avons utilisées sont celles qui ont présidé à la conception de la base RECIPE :

- Des recettes de type « familial », « fait maison » collectées auprès des ménages au cours d'enquêtes nutritionnelles (source : AFSSA) ;
- Des recettes communiquées par les industriels de l'agro-alimentaire (source : AFSSA et internet) ;
- Des recettes consignées dans les ouvrages de cuisine grand-public et à vocation spécialisée (cf. Baracco and Frentz 1982).

## Le choix du modèle

Le choix du modèle est déterminant dans la proximité à laquelle on peut s'attendre entre estimations de l'exposition et exposition « vraie », variable latente non accessible directement à l'observation. En effet, bien qu'il soit entendu qu'il ne peut à lui seul compenser les insuffisances des données injectées dans ses rouages, le modèle, par les hypothèses qui le sous-tendent, est à même de reconstituer au moins en partie l'information manquante, ou plutôt de la (re)construire.

Ces hypothèses sont formulées relativement à la réalité que le modèle a pour objectif de décrire. Dans notre cas, elles correspondent à des scénarios d'occurrence de la toxine dans différents groupes et items alimentaires, de profils de consommation des aliments vecteurs de la toxine, et de probabilité de survenue chez un même individu d'une forte consommation d'aliments contaminés à des niveaux élevés (Kroes et al. 2002).

Le modèle peut avoir pour vocation d'estimer la distribution des expositions dans une population donnée (visée de surveillance nutritionnelle et sanitaire) ou l'exposition individuelle de personnes participant à une étude épidémiologique de type étiologique (étude transversale, prospective ou rétrospective). La distinction entre niveaux populationnel et individuel pose des questions et appelle des approches méthodologiques distinctes.

Dans le cas de l'ochratoxine A, on observe une variabilité importante des niveaux moyens et des percentiles élevés des expositions estimées dans la population française, ce même en cas d'utilisation de données « source » comparables. En fonction du modèle mis en œuvre, la probabilité de dépasser la dose hebdomadaire tolérable provisoire (DHTP) proposée par le Scientific Committee for Food (SCF) de l'UE peut atteindre tantôt un niveau interpellant sinon alarmant, tantôt un niveau « insignifiant », sauf à être partisan du « risque zéro ».

Par ailleurs, l'étude de l'implication de l'OTA dans l'étiologie de maladies rénales chroniques a été largement compliquée par les difficultés rencontrées dans l'évaluation de l'exposition individuelle à l'OTA.

Nous nous sommes donc intéressés à l'étape d'évaluation de l'exposition à l'OTA dans cette double optique populationnelle et individuelle, correspondant à deux types de démarches alimentant directement ou non le processus d'évaluation du risque sanitaire associé à la consommation chronique d'OTA :

- La surveillance sanitaire : comparaison de la distribution des expositions dans une population (ici la population adulte française) aux normes toxicologiques en vigueur ;
- L'épidémiologie analytique : étude de l'association entre exposition alimentaire à l'OTA et survenue de pathologies rénales (en particulier en population tunisienne).

À noter que la première démarche peut également être mobilisée dans le cadre d'études épidémiologiques de type écologique, lorsque l'information est disponible au niveau régional, par exemple.

Ainsi, sans prétendre aucunement à l'exhaustivité, nous nous sommes posés une série de questions méthodologiques relatives à la manière dont les deux catégories de données « source » pouvaient être injectées et combinées pour produire une estimation de l'exposition. Nous en présentons ici brièvement les tenants.

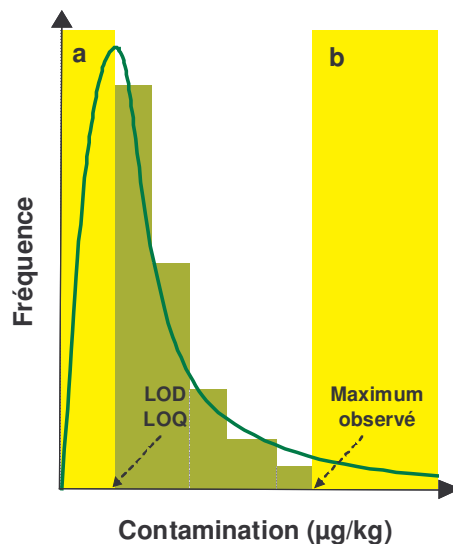
## La variabilité des niveaux de contamination (Partie 1)

Comme indiqué au tableau 1, un certain nombre de facteurs fait varier les niveaux de contamination par l'OTA qu'une personne est susceptible de rencontrer dans les aliments qu'elle consomme. Une modélisation de type « probabiliste », qui utilise des distributions de contamination comme « input » du modèle en lieu et place des niveaux moyens de contamination utilisés dans les approches « déterministes », est de plus en plus largement utilisée afin de rendre compte de cette variabilité.

Cependant, la modélisation stochastique pose au moins trois séries de questions :

- Quel type de distributions - empiriques (non paramétriques) ou lois mathématiques connues (paramétriques) - utiliser ?
- Comment rendre compte des valeurs inférieures aux limites de détection et supérieures aux maxima observés dans la construction de ces distributions ?
- Quelle fenêtre temporelle choisir pour le tirage des données de contamination relatives à un même panier de consommation ?

Le premier et le second point sont illustrés par la figure 3.



**Figure 3:** Les distributions de contamination.

Non-paramétrique (histogramme) *versus* paramétrique (courbe); non-détectés: liés aux outils de mesure (a) et maxima: liés au nombre limité de données (b).

Le dernier point, encore jamais abordé à notre connaissance dans la littérature et qui suppose de disposer de données désagrégées de consommation au niveau individuel, correspond au problème suivant : sur les  $n$  jours de consommations consignés par un individu, faut-il tirer une seule valeur de contamination par groupe d'aliments vecteurs (fenêtre temporelle « semaine »), une nouvelle valeur de contamination par jour de consommation de ce groupe d'aliments (fenêtre « jour »), ou une valeur différente à chaque fois qu'un acte de consommation d'un aliment appartenant à ce groupe est rapporté par l'individu, donc possiblement plusieurs fois par jour (fenêtre « occasion ») ? Cette question renvoie nécessairement aux hypothèses relatives aux processus qui sont à l'origine de la variabilité des niveaux de contamination rencontrés par un même individu au cours du temps.

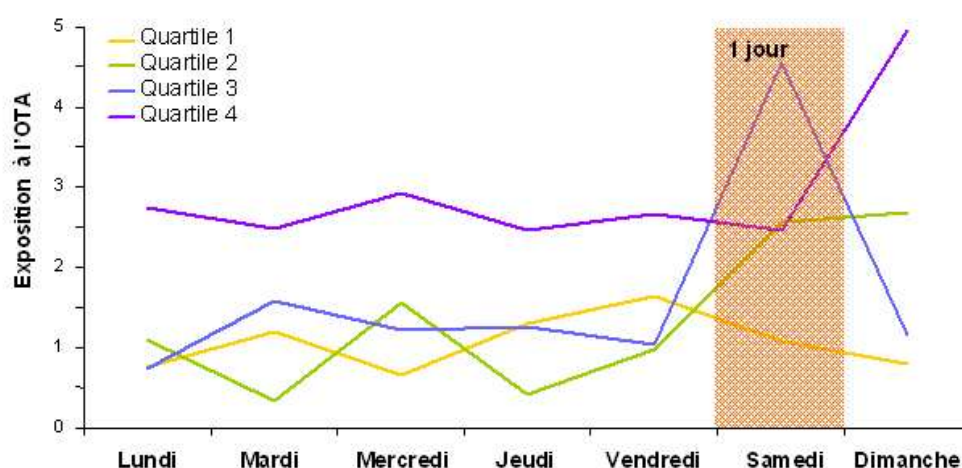
Nous abordons ces différents aspects en proposant une analyse de sensibilité par modélisation de type Monte-Carlo. Nous mettons ainsi en évidence les effets relatifs du caractère paramétrique ou non des distributions de contamination, et de la fenêtre temporelle choisie pour l'échantillonnage des valeurs de contamination sur la variabilité et l'incertitude des paramètres estimés caractérisant la distribution des expositions à l'OTA dans la population française. Cette première partie est rapportée sous la forme d'un article accepté le 24 avril 2005 pour publication dans la revue *Food and Chemical Toxicology* et paru dans le numéro 43(10), p1541-1555 (octobre 2005).

### La variabilité des ingérés alimentaires (Partie 2)

À l'instar des niveaux de contamination présents dans un même type d'aliment en fonction de l'origine des matières premières, de leur stockage et de leur transformation, les quantités d'aliments vecteurs ingérées par une personne varient au cours du temps (variabilité intra-individuelle) et varient entre personnes (variabilité inter-individuelle) en fonction de facteurs dont quelques-uns sont consignés au tableau 1.

Or la grandeur pertinente dans la plupart des études de surveillance ou analytiques est la consommation « usuelle », « habituelle » ou encore « long-terme ». Il est donc primordial, que l'application soit de type individuel ou populationnel, de séparer la variabilité journalière des ingérés, laquelle est schématisée à la figure 4 à propos des ingérés d'OTA dans la population française, de la tendance sous-jacente et considérée comme relativement constante : la consommation « usuelle ».

S'il est, à juste titre, d'usage de considérer que la moyenne d'un grand nombre de jours d'enquête constitue une estimation acceptable des ingérés habituels « vrais » (Willett 1998), il est rare qu'un nombre important de jours soit disponible. Or l'utilisation d'un petit nombre de jours de consommation peut non seulement conduire à une erreur de classification des individus relativement les uns aux autres (figure 4) mais aussi, au niveau populationnel, à surestimer les extrêmes en raison de la mauvaise appréciation de la variance globale des ingérés.



**Figure 4:** Variabilité inter- et intra-individuelle des ingérés. Exposition journalière de 4 individus appartenant aux quatre quartiles d'exposition à l'OTA dans la population française.

Le problème de l'adéquation entre le nombre de jours d'enquête alimentaire et les objectifs de l'étude en termes de précision des estimations faites se pose donc aussi bien au niveau de l'individu que de la population. Si cette question a été largement étudiée dans le cadre de l'épidémiologie nutritionnelle, nous avons relevé une absence de transposition au domaine des contaminants alimentaires en dépit de problématiques tout à fait semblables.

C'est pourquoi nous avons appliqué au cas de l'OTA, d'une part la méthode de réduction de la variance initialement proposée par Nusser et al. (1996) puis simplifiée par Hoffmann et al. (2002), et d'autre part les travaux de Nelson et al (1989), Beaton et al. (1979) et Willett (1998) sur le calcul du nombre de jours nécessaires pour estimer des ingérés alimentaires individuels avec une précision donnée.

Ces travaux sont présentés sous la forme d'une publication soumise le 9 mars dernier comme second volet de ce travail méthodologique sur la modélisation de l'exposition alimentaire à l'OTA. Après révision cet article a été accepté pour la publication le 29 août 2005 par la revue *Food and Chemical Toxicology*.

# PARTIE 1:

## HANDLING OF CONTAMINATION VARIABILITY IN EXPOSURE ASSESSMENT: A CASE STUDY WITH OCHRATOXIN A.

### I INTRODUCTION AND OBJECTIVES

#### I.1 Variability of contamination of foods over space and time

Variability in the contamination of food commodities with environmental or natural substances may occur over space and time, depending on a range of factors including species and varieties, agricultural or breeding practices, climatic conditions, season, calendar period, storage, transportation, processing and home preparation. Food mycotoxins in general and ochratoxin A (OTA) in particular do not break the rule. Ochratoxin A is a secondary metabolite of fungi such as *Penicillium verrucosum* and *Aspergillus ochraceus* that occurs in a number of food commodities like cereals, coffee, dried fruit, pulses and beans as well as in animal products by transfer through contaminated feeds (Pittet A. 2001). OTA is nephrotoxic in experimental studies and has been classified as a possible human carcinogen (group 2B of the IARC classification) on the basis of its potent renal carcinogenicity in the male rat (National Toxicology Program 1989); hence the concern as to whether foods dedicated to human consumption are contaminated and how do the levels of exposure in populations compare to the toxicological reference doses, even if no clear association with any human renal disease could be evidenced yet (Bozic et al. 1995).

Mycotoxin contamination of foods and feeds highly depends on environmental conditions that lead to mould growth and toxin production (Pittet A. 2001). Undoubtedly, the occurrence of OTA is related to climate and especially, since the post-harvest formation is regarded as the predominant factor in the contamination of foods and feeds, to harvest and post-harvest storage conditions, as exemplified by van Egmond and Speijers (1994). The seasonal variation of frequency of contamination was recently evidenced with products from the French market for most mycotoxins of concern, including OTA (Leblanc J.-C. et al. 2005). It is subsequently reasonable to assume that the observed variability in contamination incidence and levels over space and time leads to dietary exposure levels that differ in terms of central tendency, higher percentiles as well as dispersion parameters as a function of region, country, season and year. Indeed, the use of OTA in human serum as an indicator for exposure tends to display a significant variability in exposure levels between summer (higher levels) and autumn (Palli et al. 1999) or winter (Peraica et al. 2001) as well as on a calendar-year basis (Radic et al. 1997). This must nevertheless be balanced by the relative stability of levels found in a 4-year study of OTA in plasma in Tokyo (Ueno et al. 1998). Of course, another component of the variability in dietary exposure to OTA is the changing nature of food consumption patterns within individuals over time, that is from day to day, season to season and also between different life periods (age, marital/family status, illness, income). This aspect will not be addressed herein.

#### I.2 Handling of input variability through probabilistic exposure modelling

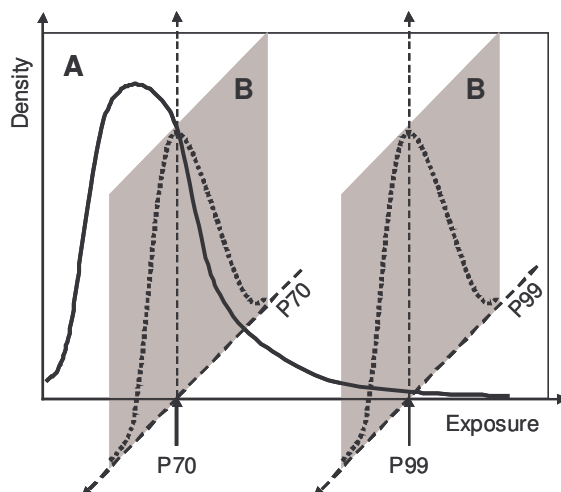
The use of biological indicators of exposure is still not the usual way of exposure assessment, either for lack of validated markers, compliance difficulties and/or missing information as to which dietary sources are the most important. Dietary exposures are instead more often assessed through some level of modelling. A model is a mathematical construct by which input data - here consumption and contamination data - are combined to estimate

quantitatively the outcome under study - here the dietary exposure to a food contaminant. In order to get a clear picture of what the distribution of exposures in a given population might look like over time, it is important to include the potential variability of input data, and particularly that of contamination levels, in the exposure modelling process. Single point or deterministic modelling involves using a single 'best guess' estimate of each variable within the model to determine the model's outcome(s). In the case of contamination data, the 'best-guess' typically consists of the average of all observed values - assuming this value represents the long-term average of truly encountered contamination levels - or a high percentile or even the Maximum Limit (ML) proposed by national or international food authorities, the last two approaches being conservative. In the meanwhile, probabilistic modelling achieved through Monte-Carlo Simulation (MCS) accounts for every possible value that each variable could take and weighs each of them by its probability of occurrence. The structure of a probabilistic model may be similar to a deterministic model with all the operators that link the variables together, except that each variable is represented by a distribution function instead of a single value (Lambe J. 2002). Therefore, it allows taking the variability of input data into account, which provides far more realistic results than that produced by simple deterministic scenarios (Vose D. 2000). Hence the great deal of interest raised by the probabilistic approach of dietary exposure modelling for a decade or so, as exemplified by the international Monte Carlo project (Gibney and van der Voet 2003).

### 1.3 Separating variability from uncertainty in output

Another important advantage of probabilistic modelling is that it allows separating and quantifying the effects of variability and uncertainty of input(s) and model(s) on both variability and uncertainty of the outcome(s) (Cullen A.C. and Frey H.C. 1999). In the framework of this research, we define the variability of a quantity (described as a statistical variable) as the true heterogeneity of this quantity within the population under study. This 'diversity' cannot be reduced through further measurement, but could be better characterized with additional data. Uncertainty, on the other hand, refers to a 'lack of knowledge' about the characteristics of the quantity, such as the parameters describing it - in other words, a certain level of ignorance about the parameters that best describe the variable distribution. This knowledge may be improved by further and refined measurements.

Figure 1 illustrates graphically that the variability of a variable – here 'exposure' - and the uncertainty around estimates of its moments and other descriptive parameters, such as percentiles, are defined as distributions.



**Figure 1:** Variability and uncertainty as distributions.

*A: Variability.* The PDF (full-line) represents the distribution of exposures in the population under study, with parameters estimated through MCS (ex: estimated P70 and P99).

*B: Uncertainty.* The PDFs (dot-lines) represent the distributions of parameters of exposure (cf. A) constructed from MCS (ex: distributions of P70 and P99).

#### 1.4 Research objectives

The aim of the present paper is to quantify variability of exposure estimates (Figure 1, A plane) and uncertainty of exposure distribution parameters (Figure 1, B planes) as a result of the nature of input and model implemented to take contamination variability into account, that is due to the propagation of model uncertainty. More precisely, we investigate the influence of (1) the type of contamination distribution function developed from empirical contamination data sets to be used as input in the model, as well as (2) the time-scale at which contamination variability is supposed to occur, which pertains to the structure of the model, and which we call ‘time-window’.

The question of whether to use parametric (P) or non-parametric (NP) approaches for developing cumulative distribution functions (CDFs) as input in an exposure model has been discussed by Vose (2000) in general and by Tressou et al. (2004) for OTA in particular, who both recommended the use of non-parametric distributions which are more ‘realistic’ provided a sufficient number of quantified values are available.

As far as the time-window for sampling contamination data is concerned, we did not find any results pertaining to its influence. Yet it seems reasonable to hypothesize that different foods belonging to the same food group but eaten at different occasions within an individual’s diet will show varying levels of contamination over time. Now, contamination variability may arise at different time-scales, depending on those numerous factors cited above.

We choose the exposure of the French population to Ochratoxin A as a case study because: (a) the variability of OTA occurrence in foods over time, both in terms of frequency and absolute levels, has been evidenced (cf.I.1.) and (b) former assessments of exposure proved to be very sensitive to model structure, leading to conflicting scenarios and conclusions about the probability to exceed Provisional Tolerable Weekly Intake (PTWI) and its Tolerable Daily Intake (TDI) counterpart (Gauchi and Leblanc 2002; Leblanc J.-C. et al. 2004; Leblanc J.-C. et al. 2005; Tressou et al. 2004; Verger P. et al. 1999). Hence this example is of interest both in terms of discussing methodological pitfalls pertaining to dietary exposure assessment in

general and formulating recommendations directed to those involved in the analysis of the health risk that can be attributed to dietary exposure to OTA in France.

## II MATERIALS AND METHODS

### II.1 Input data description

#### II.1.1 Contamination data

We used ochratoxin A contamination data arising from national surveillance plans performed in France from 1998 to 2002. Samples were not targeted but taken at different places in order to be representative of raw commodities that compose what French people finally eat (processed food). Ochratoxin A analyses were performed according to standard validated methods based on solid-phase extraction followed by HPLC determination and eventually a further confirmation step.

The set covers 13 food groups consisting of raw commodities (such as rice and wheat) and processed products (breakfast cereals, wine). It comprises 2740 analytical values among which 1624 non-detects (analytical values under the limit of detection) and 95 values lying between the limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ).

Contamination data were divided into 13 food groups according to their description (raw *versus* processed cereals, fruits, drinks) and subsequent comparison of means. When means were statistically different, as for the ‘wheat’ and ‘whole wheat’ groups, we kept two separate food categories. We otherwise merged data into a single group. Table 1 shows descriptive statistics for the 13 groups.

Food group	Mean	SD	Min	Median	Max	ND(%)	<LOQ(%)	N
Wheat	0.44	0.68	0.10	0.35	6.30	39.7	17.9	224
Whole wheat	0.82	0.94	0.10	0.50	4.40	15.5	20.7	58
Semolina-bulgur	0.15	0.12	0.10	0.10	0.67	81.8	15.2	66
Breakfast cereals	0.39	0.37	0.10	0.50	2.00	43.8	3.1	32
Corn	0.44	0.29	0.10	0.50	1.70	25.4	5.1	59
Rice	0.59	0.25	0.50	0.50	1.40	0.0	0.0	16
Other cereals	1.62	2.11	0.10	0.74	11.10	6.3	12.5	48
Raisins	0.68	1.17	0.10	0.15	4.30	7.7	46.2	13
Dried fruits	0.22	0.29	0.05	0.15	1.60	37.5	53.1	32
Fruit juices	0.05	0.05	0.01	0.06	0.15	37.5	0.0	16
Pork (kidney)	0.24	0.32	0.05	0.10	6.10	66.8	0.0	1011
Coffee	0.85	1.68	0.02	0.60	9.83	27.6	0.0	76
Wine	0.14	0.36	0.01	0.01	4.33	66.6	0.0	1089

Parameters are estimated after replacing values below LOD with LOD/2 and values lying between LOD and LOQ with (LOD+LOQ)/2; SD: standard deviation; Min: minimum; Max: maximum; ND: non-detects (values below LOD); <LOQ: % values lying between LOD and LOQ.

**Table 1:** Descriptive statistics of OTA contamination data set by food group ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )

#### II.1.2 Consumption data

We used the French INCA (Enquête Individuelle et Nationale sur les Consommations Alimentaires, 1999) food consumption database. The original sample of 1985 healthy adults

(aged 15 and over) is representative of the French population through stratification (region of residence, agglomeration size) and use of the quota method (age, gender, household size, individual occupation and socio-professional status) (Volatier J.-L. 2000). Subjects were asked to complete a seven-day food record diary (consecutive days) as well as other questionnaires on anthropometrical and socio-economical factors. Participants could estimate portion sizes through comparison of their actual consumption with photographs compiled in a manual adapted from the SuViMax picture booklet (Hercberg S. et al. 1994). Food records were subsequently coded into 895 food items (INCA nomenclature).

We excluded people identified as under-reporters according to the ratio of energy intake to estimated basal metabolic rate, as well as those for whom no individual body weight was informed. We excluded people identified as severe under-reporters according to the ratio of energy intake to estimated basal metabolic rate. Briefly, following Schofield (1985) and Goldberg et al. (1991), identification of the individuals' reporting status was based on fundamental principles of energy physiology. Basal metabolic rate (BMR) was first estimated using gender-age-weight specific equations computed by Schofield (1985). Dietary reporting status was then assessed as suggested by Goldberg et al. (1991) by computing a ratio of reported energy intake (EI) to estimated basal metabolic rate (BMR). Tabulated cut-off limits for this EI/BMR ratio have been derived by Goldberg et al. (1991) from whole-body calorimeter and doubly-labelled water measurements in a wide range of healthy adults. Among our study sample, ratios falling below the 1.1 limit were recognized as being incompatible with long-term maintenance of energy balance and therefore with long-term survival.

The age-gender structure of the resulting 1434-subjects study sample is described in Table 2.

Age group	Gender			
	15-25	26-54	55-75	76+
Male	121	345	168	24
Female	145	432	174	25
Total	266	777	342	49

**Table 2:** Age-gender structure of the study sample (N=1434)

In order to combine consumption and contamination data, we complemented the French RECIPE database (Calamassi-Tran 2004). This resulted in a table of 276 items (food commodities) by 13 food groups, filled with conversion factors taking account of recipes composition, retention as well as yield factors. Retention factors account for losses due to heating or draining or any other chemical or physical degradation of the toxin, such as losses of OTA during coffee processing (roasting and grinding). Yield factors provide rough estimates of cooking weight losses or gains, for instance loss of water when baking dough to bread or gain of water when boiling pork during ham-making. The table was used to transform the weight of prepared mixed dishes (food-as-consumed data as recorded in diaries, that is food items coded from the INCA survey) into the weight of raw single foods (ingredients, that is raw commodities for which contamination data were available from national monitoring plans).

Table 3 shows descriptive statistics for the consumption of the 13 defined food groups among individuals of the study sample (N=1434).

Food group	Mean	SD	P2.5	Median	P95	P97.5	P99	Max	%consumers*
Wheat	112.71	67.85	18.95	102.83	228.79	279.54	334.32	709.45	99.8
Whole wheat	2.19	9.63	0.00	0.00	13.80	28.34	53.23	110.40	9.8
Semolina, Bulghur	18.10	16.39	0.00	14.32	49.07	60.00	81.76	120.71	87.8
Breakfast cereals	3.75	13.95	0.00	0.00	25.71	50.00	71.43	157.14	13.1
Corn	1.42	5.60	0.00	0.00	8.57	21.21	28.93	54.00	11.0
Rice	7.54	9.09	0.00	4.71	25.93	33.00	37.71	57.04	64.4
Other cereals	11.20	31.75	0.00	0.00	76.89	108.43	152.79	349.93	26.3
Raisins	0.23	1.17	0.00	0.00	1.37	2.06	3.43	35.71	14.9
Dried fruits	0.63	3.93	0.00	0.00	3.14	6.00	10.04	89.29	12.9
Fruit juices	56.30	97.52	0.00	0.00	238.57	304.29	428.57	966.43	49.3
Pork	24.39	24.95	0.58	18.33	67.59	100.42	151.81	213.76	98.0
Coffee	9.93	10.57	0.00	7.07	30.00	36.29	47.91	98.43	80.5
Wine	116.79	178.93	0.00	38.57	485.71	600.00	828.57	1328.57	64.5

\*An individual is considered as 'consumer' of a given food group as long as he/she reported having eaten one or more food item(s) from that group at least once during the record period.

**Table 3:** Descriptive statistics of the consumption data set (g/day) by food group

## II.2 Exposure modelling

### II.2.1 General exposure model

The general exposure model used to assess intakes from the diet can be written as follows (equation (1)):

$$E_i = \frac{\sum_k \sum_t Q_{i,t,k} \times C_{i,t,k}}{n_i \times bw_i} \quad (1)$$

Where:

- $i$  is an index for individual:  $i=(1, \dots, 1434)$ ,
- $E_i$  is the usual intake of individual  $i$  (ng/kg body weight/day),
- $t$  is an index for time window to assess food consumption and contamination: weeks (W), days (D) or single occasions (O) of consumption,
- $k$  is an index for food group:  $k=(1, \dots, 13)$ ,
- $Q_{i,t,k}$  is the consumption of food group  $k$  on occasion  $t$  by individual  $i$  (kg),
- $C_{i,t,k}$  is the contamination of food group  $k$  encountered on occasion  $t$  by individual  $i$  ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ),
- $n_i$  is the number of days of food records available for individual  $i$ ,
- and  $bw_i$  is the body weight of individual  $i$  (kg).

### II.2.2 Probabilistic approach

Time-window for the fluctuation of contamination levels (W, D and O)

In the probabilistic approach, contamination is not regarded as constant as in a deterministic scenario, but varies instead, from individual to individual, and from one occasion of consumption to the other.

We hypothesized that the structure of the model regarding time-window for sampling contamination values may significantly influence the outcome, both in terms of variability of estimated intakes and uncertainty around statistical parameters describing them. The probabilistic scheme that we implement in the present research allows us to test the influence

of three alternative assumptions about the time-scale at which variability occurs, each describing a different correlation structure for contamination levels among foods from the same food group eaten by the same individual over time:

- The ‘Week’ time-window (W) implies a 100% dependence of contamination levels within food groups eaten during a week;
- The ‘Day’ time-window (D) suggests a 100% independence of contamination levels within food groups on consecutive days but 100% dependence within the same day;
- The ‘Occasion’ time-window (O) assumes 100% independence of contamination levels between food items within food groups. By ‘occasion’ we refer to a single eating event corresponding to the consumption of a single food item.

We performed three independent simulations with three different time-windows. At each iteration of a simulation, sampling of contamination values was done (refer to equation (1) for legend):

- On a weekly basis (W): one value  $C_{i,k}$  is drawn per individual and per food group for the whole study period, which can be written as follows (equation (2)):

$$E_i = \frac{\sum_{k=1}^{13} Q_{i,k} \times C_{i,k}}{n_i \times bw_i} \quad (2)$$

- On a daily basis (D): one value  $C_{i,j,k}$  is drawn per individual and per food group on each day of food consumption (equation (3)):

$$E_i = \frac{\sum_{k=1}^{13} \sum_{j=1}^{n_i} Q_{i,j,k} \times C_{i,j,k}}{n_i \times bw_i} \quad (3)$$

- On a single occasion basis (O): one value  $C_{i,o,k}$  is drawn per individual each time the food group is reported to have been consumed by the participant (equation (4)), with a total number of  $o_{k,i}$  occasions of consumption for food group k ‘within’ individual  $i$ :

$$E_i = \frac{\sum_{k=1}^{13} \sum_{o=1}^{o_{k,i}} Q_{i,o,k} \times C_{i,o,k}}{n_i \times bw_i} \quad (4)$$

#### Distributions development for Monte-Carlo simulations

In the probabilistic exposure model, contamination levels ( $C_{i,t,k}$  in equation (1)) are drawn randomly from underlying cumulative distribution functions (CDFs) in a one-dimension Monte-Carlo simulation. ‘Less-than’, that is to say values lying below LOD (limit of detection), also called non-detects, or lying between LOD and LOQ (limit of quantification), may be handled in several ways.

### Non-Parametric distributions (NP)

Empirical CDFs were derived from the 13 food vectors of raw contamination values, with non-detects replaced with  $LOD/2$  and values lying between LOD and LOQ replaced with  $(LOQ + LOD)/2$ . In this case, ‘less-than’ are thus replaced by constant values.

### Parametric distributions (P)

Assuming log-normality of the data, we fitted parametric probability density functions (PDFs), taking account of left-censored (non-detects) as well as interval-censored data (values lying between LOD and LOQ) through maximum likelihood estimation (MLE).

In this approach, parameters estimates are obtained by numerically maximizing the likelihood function given by equation (5):

$$L(\theta) = \prod_{i=1}^n l(\theta, x_i) \quad (5)$$

Where:

$$l(\theta, x_i) = \left\{ \begin{array}{lll} f(\theta, x_i) & \text{Uncensored} & (x_i > x_{ui}) \quad x_{ui} = LOQ \\ F(\theta, x_{li}) & \text{Left - censored} & (x_i \leq x_{li}) \quad x_{li} = LOD \\ F(\theta, x_{ui}) - F(\theta, x_{li}) & \text{Interval - censored} & (x_{li} < x_i \leq x_{ui}) \end{array} \right\}$$

$f(\theta, x)$  is the probability density function (PDF), here the lognormal PDF,  
 $F(\theta, x)$  is the cumulative distribution function (CDF), here the lognormal CDF,  
 $\theta$  is the vector of parameters to be estimated,  
 $(x_1, \dots, x_n)$  are the random observations, including censoring values (here LOD and LOQ),  
and  $(x_{li}, x_{ui})$  is the interval in which the  $i^{\text{th}}$  unit is interval-censored (here (LOD, LOQ)).

The vectors of lognormal estimated parameters (SAS<sup>®</sup> RELIABILITY procedure) are shown in Table 4.

Food group	Mean	SD
Wheat	-1.296	0.956
Whole wheat	-0.638	0.933
Semolina, Bulghur	-2.359	0.83
Breakfast cereals	-1.317	0.953
Corn	-0.976	0.639
Rice	-0.585	0.301
Other cereals	-0.08	1.044
Raisins	-1.779	1.77
Dried fruits	-1.317	0.953
Fruit juices	-3.534	0.99
Pork (kidney)	-2.127	1.19
Coffee	-1.794	2.105
Wine	-1.544	1.221

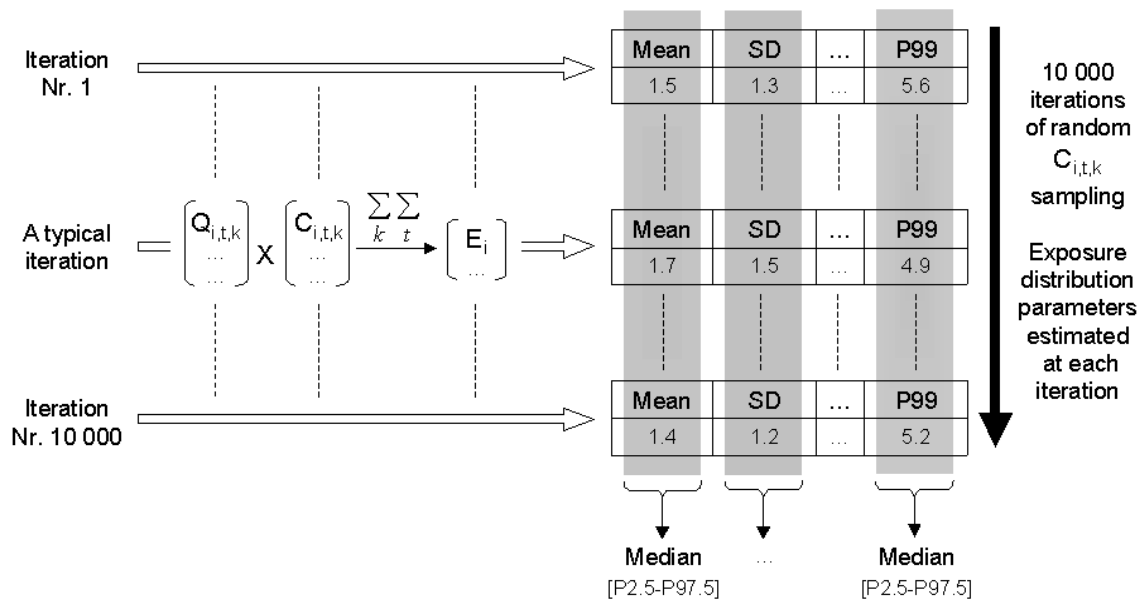
**Table 4:** Maximum Likelihood Estimates of Log-Normal PDFs parameters for contamination data by food group

## Monte-Carlo simulations

Figure 2 illustrates the Monte-Carlo sampling design we adopted and the sequence of operations implemented within an iteration. A typical iteration consisted in sampling contamination values either on a weekly (W), daily (D) or occasion (O) basis, and combining them with consumption data, according respectively to equations (2), (3) or (4), into estimates of usual OTA intakes ( $E_i$ ). Each iteration hence resulted in a between-persons distribution of 1434 individual exposure estimates. Simulations were run on the SAS<sup>®</sup> System: we wrote ad hoc SAS<sup>®</sup> macros - one for each ‘contamination CDF/time-window’ combination - in which we called the RANNOR or RANTBL functions (Fan X. et al. 2002) to draw random values respectively from lognormal (P) or empirical (NP) CDFs. We assumed 100% independence of contamination levels between food groups.

### Estimation of between-persons distribution parameters and 95%CI

Figure 2 depicts the subsequent method used to derive single (synthetic) estimates of distribution parameters across each simulation as well as their uncertainty (95% confidence intervals – 95%CI). The simulation process is described as a ‘second-order Monte-Carlo simulation’ since it characterizes both the variability of the output variable and the uncertainty we have about what that true distribution of variability really is (Vose D. 2000).



**Figure 2:** Estimation of between-persons exposure distribution parameters and 95%CI through second-order Monte-Carlo simulation. A typical simulation runs 10 000 iterations. At each new iteration (horizontal white arrow),  $C_{i,t,k}$  are drawn randomly, either from lognormal (P) or from empirical (NP) CDFs.  $Q_{i,t,k}$  are constant through all iterations within a given simulation scenario. Each iteration gives one set of estimates of between-persons distribution parameters (2-row tables). Estimation of overall parameters (e.g. synthetic estimates over 10 000 iterations, vertical black arrow) and their 95%CI is done by calculating the median and percentiles 2.5 (P2.5) and 97.5 (P97.5) across 10 000 values for each distribution parameter (vertical gray bars).

### II.2.3 Estimation and plotting of exposure distributions

Estimating the density of exposure distributions involves approximating a hypothesized PDF from the simulated data. We performed kernel density estimation (Silverman B.W. 1986), a nonparametric technique for density estimation in which a known density function (the kernel) is averaged across the observed data points within an interval  $h$  to create a smooth approximation. We applied the SAS<sup>®</sup> KDE procedure that uses a Gaussian density as the kernel, and plotted the resulting smoothed PDFs.

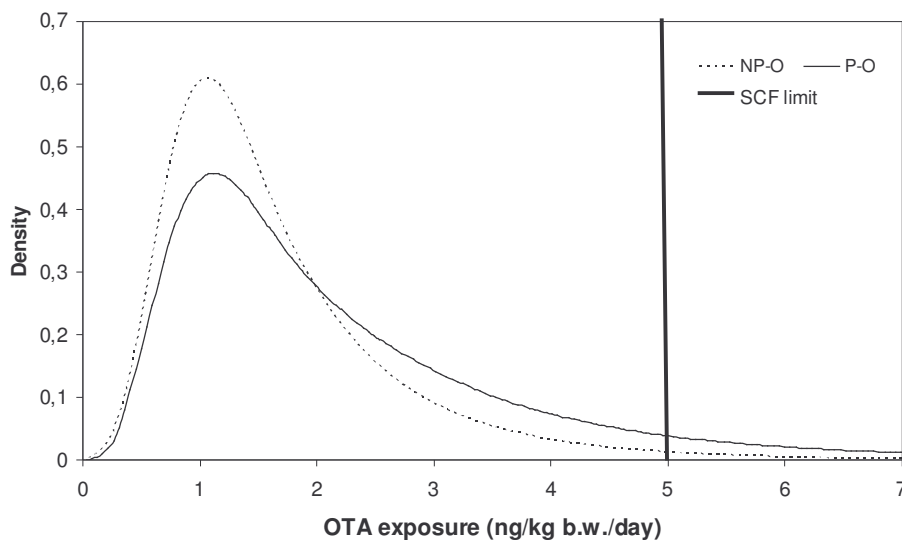
## III RESULTS

### III.1 Variability of exposure estimates

#### III.1.1 Non-parametric *versus* parametric CDFs

If we first look at the overall differences between non-parametric (NP) and parametric (P) approaches used to develop contamination CDFs, we notice that, disregarding the time window for sampling contamination values, parametric sampling leads to a global shift of the distribution of exposures to the right (see Figure 3).

Our results also point out a greater variability (wider dispersion) of exposures within the P than within the NP models. These effects are illustrated in table 5 by the fact that position parameters estimates are systematically higher in P models, as shown with mean: 1.68 (NP) *versus* 2.29 (P) ng OTA/kg b.w./day. Moreover, the higher the percentiles, the more significant the climb. This is particularly remarkable with respect to P97.5: 4.62 (NP-O) *versus* 7.11 (P-O) ng OTA/kg b.w./day. Dispersion parameters estimates (standard deviation: SD, coefficient of variation: CV, inter-quartile range: IQR and range) are also systematically greater, time-window being otherwise equal.



**Figure 3:** PDFs of dietary exposure to OTA: ‘Non-Parametric’ (NP-O) *versus* ‘Parametric’ (P-O) scenario. Example: ‘Occasion’ as time-window for sampling contamination data. Distributions are estimated through MCS.

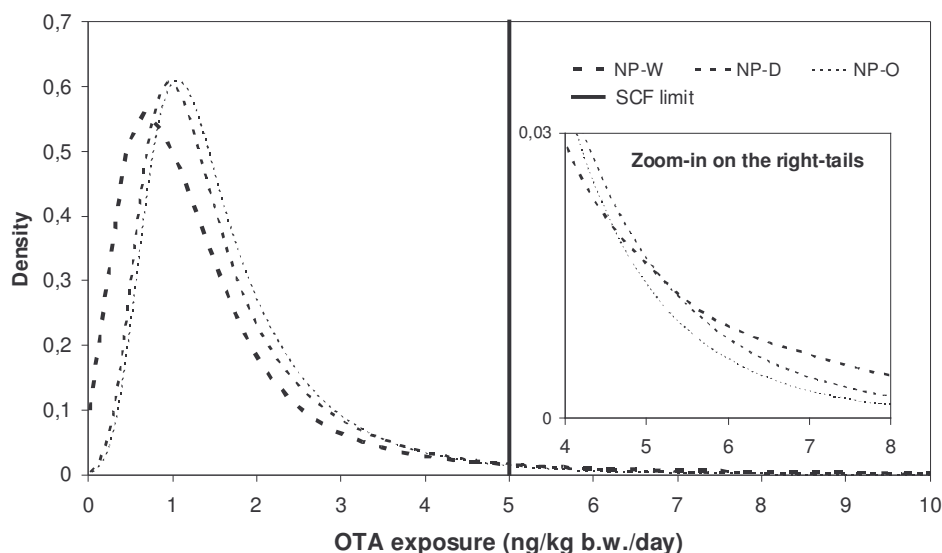
<b>Model</b>	<b>Mean</b>	<b>SD</b>	<b>CV(%)</b>	<b>IQR</b>	<b>Range</b>	<b>P5</b>	<b>Q1</b>	<b>Median</b>	<b>Q3</b>	<b>P95</b>	<b>P97.5</b>	
<b>NP</b>	<b>W</b>	1.68 [1.58,1.80]	2.20 [1.81,2.84]	130.7 [113.3,162.4]	1.20 [1.11,1.30]	29.44 [18.64,64.52]	0.30 [0.28,0.32]	0.64 [0.61,0.68]	1.11 [1.06,1.16]	1.84 [1.75,1.94]	4.85 [4.29,5.53]	7.31 [6.17,8.86]
	<b>D</b>	1.68 [1.64,1.73]	1.28 [1.15,1.40]	75.0 [69.9,81.9]	1.13 [1.05,1.21]	12.97 [9.05,20.92]	0.52 [0.50,0.55]	0.90 [0.88,0.93]	1.32 [1.29,1.36]	2.03 [1.96,2.11]	4.06 [3.80,4.36]	5.10 [4.68,5.58]
	<b>O</b>	1.68 [1.65,1.72]	1.11 [1.04,1.20]	65.8 [62.2,70.2]	1.08 [1.02,1.15]	10.78 [8.02,16.58]	0.57 [0.54,0.60]	0.97 [0.95,1.00]	1.39 [1.36,1.43]	2.06 [1.99,2.12]	3.77 [3.57,3.99]	4.62 [4.30,4.98]
<b>P</b>	<b>W</b>	2.28 [2.12,2.52]	3.43 [2.59,7.77]	150.3 [119.8,312.6]	1.76 [1.62,1.91]	59.65 [28.57,252.44]	0.34 [0.32,0.37]	0.77 [0.73,0.81]	1.37 [1.30,1.43]	2.53 [2.39,2.68]	6.80 [6.11,7.66]	9.79 [8.44,11.55]
	<b>D</b>	2.29 [2.29,2.39]	2.08 [1.80,3.24]	90.7 [80.9,137.0]	1.74 [1.63,1.85]	26.58 [15.40,93.27]	0.56 [0.53,0.60]	1.06 [1.03,1.10]	1.70 [1.64,1.75]	2.80 [2.69,2.91]	5.87 [5.46,6.34]	7.55 [6.87,8.40]
	<b>O</b>	2.29 [2.23,2.37]	1.85 [1.67,2.59]	80.7 [74.2,110.8]	1.72 [1.63,1.83]	20.56 [12.97,69.13]	0.61 [0.58,0.64]	1.13 [1.09,1.16]	1.75 [1.70,1.80]	2.85 [2.76,2.95]	5.68 [5.34,6.05]	7.11 [6.56,7.76]

Q1: first quartile (percentile 25); Q3: third quartile (percentile 75).

**Table 5:** Descriptive statistics of dietary exposure to OTA (ng/kg b.w./day) estimated through six probabilistic scenarios and their [95%CI] (MCS)

### III.1.2 'Week' versus 'Occasion' as time-window

Turning our attention to the time-window used for sampling contamination values, we find that, except for mean and IQR which, if not fully, almost levels off, both dispersion parameters and higher percentiles estimates experience a considerable rise when comparing 'Occasion' with 'Week', 'Day' being intermediate (see Figure 4).



**Figure 4:** PDFs of dietary exposure to OTA: 'Week' (NP-W) versus 'Day' (NP-D) versus 'Occasion' (NP-O) scenario. Example: 'Non-Parametric' PDFs for sampling contamination data. Distributions are estimated through MCS.

This is particularly striking in the case of coefficient of variation (CV) that climbs, as shown in Table 5, from 66 to 131% within the NP models and from 81 to 150% within the P models. Correlatively, P97.5 expands from 4.62 to 7.31 and from 7.11 to 9.79 ng OTA/kg b.w./day within NP and P models respectively. Thus the shorter the sampling time-frame (window), the heavier the right tail of the distribution.

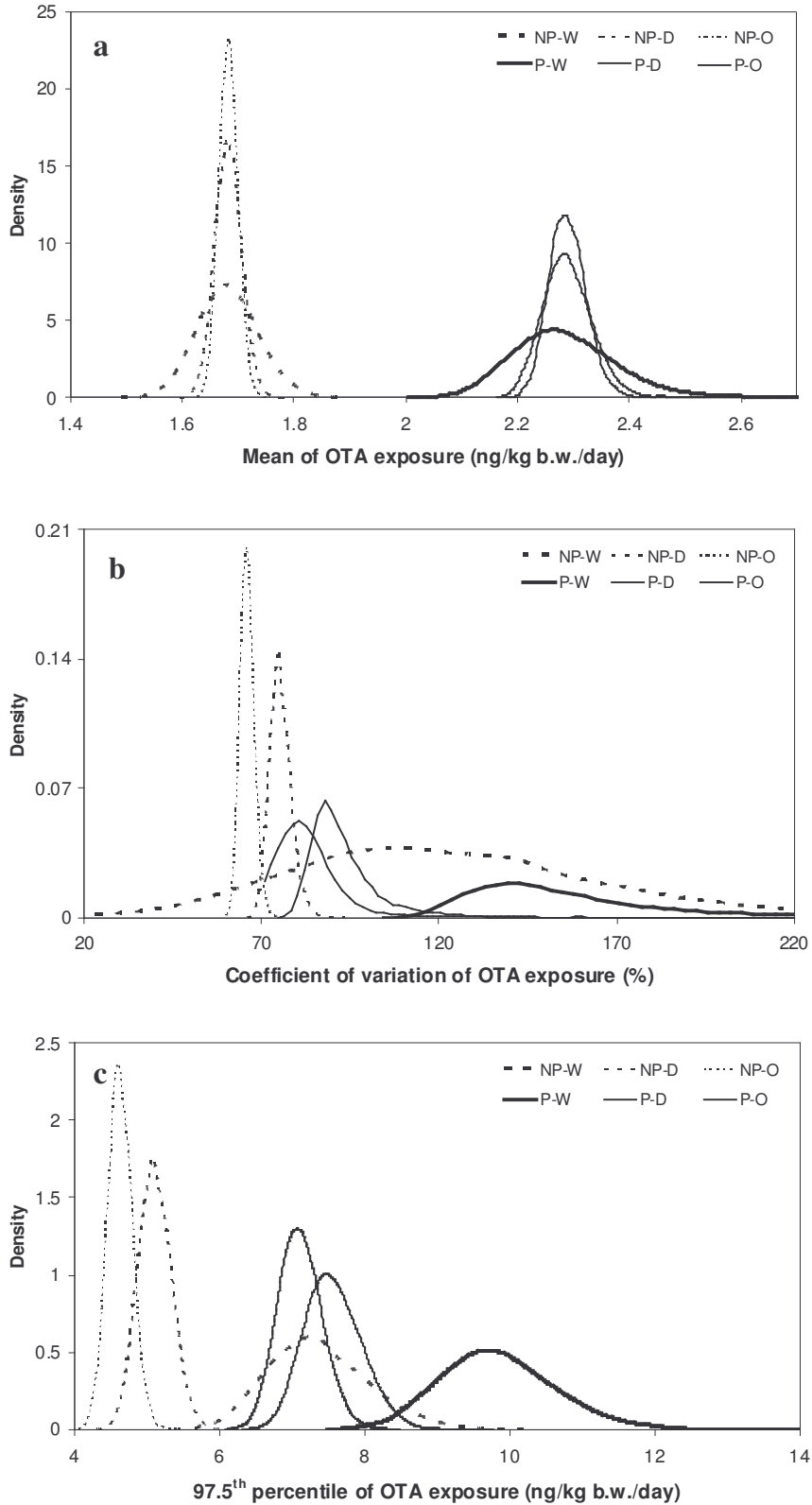
## III.2 Uncertainty of parameters estimates

### III.2.1 Non-parametric versus parametric CDFs

Uncertainty of parameters estimates was characterized by constructing 95%CI across 10 000 iterations and plotting corresponding PDFs (Figures 5a-f). Our results (Table 5) show that 95%CI are systematically larger for P compared to NP models, time-window being otherwise equal. Figures 5a (mean), 5b (CV) and 5c (P97.5) are particularly explicit with this respect. In particular, [95%CI] (interval length) of P97.5 expands from [4.30;4.98] (0.68) within NP-O to [6.56;7.76] (1.2) within P-O scenarios.

These results directly refer to the differential in extend of contamination variability accounted for by the two types of models: parametric CDFs tend to show wider dispersion (as quoted earlier), especially regarding higher percentiles, while non-parametric CDFs are right truncated and usually have lighter right tails. This is also in line with results pertaining to variability: the more variable the exposures, the more uncertain their estimates.

Interestingly, we also found that lower percentiles estimates do not show any substantial difference, neither regarding median values nor uncertainty surrounding it, when turning from a NP to a P approach.



**Figures 5a-c:** PDFs of parameters of dietary exposure to OTA. Distributions are estimated through MC simulations. a: mean – b: CV – c: 97.5<sup>th</sup> percentile.

### III.2.2 'Week' versus 'Occasion' as time-window

Our results point out a larger uncertainty around 'Week' than around 'Occasion' estimates of distribution parameters, as shown clearly in Table 5 as well on Figures 5a (mean), 5c (P97.5) and most dramatically on Figure 5b (CV). Noticeably, [95%IC] (interval length) of P97.5 expands from [4.30;4.98] (0.68) to [6.17;8.86] (2.69) and from [6.56;7.76] (1.2) to [8.44;11.55] (3.11) ng OTA/kg b.w./day within NP and P models respectively. Again, uncertainty of lower percentiles and even median is hardly affected by the time-window used to sample contamination data.

This is line with our results about variability, as quoted earlier. 'Aggregating' consumption data at the 'Week' level (averaging over seven days before sampling contamination data) also reduces the size of the consumption data set compared to the non-aggregated option leaving each 'Occasion' of consumption as declared. Hence fewer contamination values are sampled within each iteration (8754 for 'Week' versus 60411 for 'Occasion'), leading to a smaller sample size which is known to increase uncertainty.

## IV DISCUSSION

This research sought to assess the influence of contamination variability as well as uncertainty in its handling on both the variability and the uncertainty of distributions of dietary exposures, taking OTA as an example. We originally hypothesized that, in the framework of probabilistic exposure modelling, the time window chosen to perform the sampling of contamination values would considerably impact the output distribution of exposures. It has also been suggested that the type of distribution chosen for contamination values was an important factor to be considered.

### IV.1 Parametric or non-parametric CDFs

As far as the influence of distribution development for sampling contamination values is concerned, we found that the parametric (log-normal) approach of probabilistic modelling shifted the overall distribution of exposures to the right, and generated both more variable and more uncertain outputs than with the non-parametric distributions, especially as far as higher percentiles are concerned.

These results are made possible by the fact that in the non-parametric approach, the maximum contamination value that can be drawn within iterations is constrained by the highest analytical value available in the set of observed data (the 'Max' quoted in Table 1). On the other hand, the parametric approach allows that contamination values higher than the maximum observed - drawn from the fitted log-normal PDFs - be sampled, depending to a certain extent on the number of sampling iterations. Consequently, when high values are drawn for food groups which contribution to exposure is high or if, by chance, several high values of contamination are drawn at the same time for several food groups, then the resulting distribution of exposures to OTA will prove to be both shifted to the right (higher mean and right tail) and more variable (wider range and greater dispersion parameters). Another difference between the two distribution development approaches is the handling of 'less-than': 'fully' taken into account by the parametric adjustment, and only addressed through replacement by a fixed value in the non-parametric approach, which may also strongly influence higher exposures (Tressou et al. 2004).

The question is then which explanation fits the best between under-estimation by the non-parametric approach or over-estimation by the parametric one?

In case of small sample sizes, sampling error might have occurred, and real underlying range of contamination variability may not have been fully taken into account for lack of representativity and high proportion of 'less-than'. A non-parametric approach would then potentially lead to an under-estimation of exposures - both central tendency and high percentiles - since, as pointed out earlier, no value higher than the maximum observed can be drawn.

With respect to this, the parametric approach has two advantages over the non-parametric one. Firstly, it allows trying and correcting for uncertainty due to censorship (left- and interval-) through MLE. Secondly, it lets contamination values higher than the maximum observed be sampled, possibly accounting for the fraction of variability not caught in the empirical data set, provided that right tails are not badly over- or under-estimated (Tressou et al. 2004). The drawback is also double: by assuming a specific shape for the distribution, here a Log-Normal distribution which is frequently used to model positively skewed contaminant concentration distributions (Singh A.K. et al. 1997), it introduces some level of uncertainty. Little is actually known about the process underlying natural toxins production (secondary metabolism) and accumulation within food. It might actually show quite different patterns from the ones involved in environmental pollutants dissemination and accumulation along the food chain.

Moreover, the implementation of maximum likelihood techniques produces best-fit estimates of parameters that are attracted where data are numerous so that extremes are not well accounted for, either leading to over- or under-estimation of higher percentiles of contamination. As an example, Cárcamo and Ocio Armentia (2001) stated that, as far as pesticide residues were concerned, when the amount of data is limited (less than a 100 or so), the lognormal distribution is a good option to introduce contamination data into dietary exposure models. They nevertheless acknowledged that lognormal input format tends to over-estimate upper percentiles, especially those above P97.5, and considered the possibility of using a truncation of the right tail, yet concluding that further research was needed on how to practice it. We actually believe that when the lack of data is compensated by *a priori* assumptions (parametric distribution), this should be done with a more robust method for addressing the fit in the right tail area. This of course introduces considerable conceptual complexity in the exposure assessment framework.

Finally, the non-parametric approach has the advantage of conceptual simplicity, though its computational implementation might not be that straightforward, and the avoidance of assuming some distribution form. Moreover, statistical techniques pertaining to the handling of 'less-than' in the development of non-parametric distributions are presently in progress, as Tressou J. (2005) suggests with the Kaplan-Meier estimator. Tressou actually undertook a sensitivity analysis pertaining to different approaches for dealing with non-detects in the non-parametric analysis on the same case study (chronic exposure of the French population to OTA). The cited paper (under revision) concludes that the proposed Kaplan-Meier procedure outputs a distribution that lies between exposure distributions estimated from two different approaches for handling non-detects (referred to by the author as M2 and M3): replacing them with LOD/2 (M2) or zero (M3). This is observed even in the right tail, while it is not always true for parametric procedures. Since exposures from the M3 distribution are by definition the smaller, and given that censorship affects about 80% of the data, the true distribution of exposure should be between the M2 and M3 distribution. These results and remarks altogether

mean that the KM procedure is reliable, but also that M2 and more evidently M3 approaches give acceptable estimates of true distribution of exposures in the case of OTA. Since we used the M2 scenario in the non-parametric simulations, we believe our results are robust to the handling of non-detects, even in the higher percentiles, though implementing the M3 and KM procedures could be of evident value in a comparative perspective.

These remarks, added to our results showing greater uncertainty around exposure estimates in the parametric approach, let us believe that parametric sampling should not be recommended, unless sufficient data above the limit of detection are available and provided the chosen parametric distribution makes sense to describe underlying process at stake for the production and accumulation of toxins in food commodities. In accordance with our views, Vose (2000) believes that the parametric distributions should only be selected if either: (1) the theory underpinning the distribution applies to the particular problem, (2) it is generally accepted that a particular distribution has proven to be accurate for modelling a specific variable without actually having any theory to support the observation, or (3) the distribution approximately fits the expert opinion being modeled and required level of accuracy is not very high.

As a conclusion, when a probabilistic approach with parametric distributions is adopted in spite of empirical data scarcity, it should be kept in mind that the estimation of exposure distributions will tend to be heavily over-estimated, as exemplified by the following comparison of scenarios. The mean and percentile 97.5 of exposures actually reach 2.28 and 9.79 ng/kg b.w./day with the 'P-W' probabilistic model - which is often the implicit scenario - while a deterministic model using individual consumption data (7 consecutive days of food records) coupled with point estimates of contamination levels by food group (arithmetic means replacing non-detects with zero or LOD/2, depending on the level of censoring and following recommendations by GEMS/FOOD-Euro (1995)) would output respectively 1.68 and 3.85 ng/kg b.w./day for the same parameters (Council É. et al. 2005b). Consequently, a deterministic model might be preferable to a probabilistic one in case of high uncertainty on input contamination data.

## IV.2 Time window for contamination sampling in probabilistic modelling

Our results also clearly show that the time-window has a strong influence on the variability of exposure estimates as well as on the uncertainty of distribution parameters as simulated through the implementation of Monte-Carlo techniques. We actually found that the 'Week' scenario output more variable and more uncertain exposure distributions than the equivalent 'Occasion' one, especially as far as higher percentiles are concerned. Disregarding the (non)parametric nature of the model, this tendency is dependent upon the fact that in the case of a 'Week' model, a single value of contamination is drawn at each new iteration for a given 'individual-food group' combination (the  $C_{i,k}$  in equation (3)), this value being possibly, though less probably, very high (or very low) and assumed constant within the calculation of  $E_i$ , allowing higher (or lower)  $E_i$  estimates than would be found with mean contamination levels ( $C_k$ ). At the opposite, the 'Occasion' model implies that, at each new iteration, as many contamination values are drawn for a given 'individual-food group' combination as the number of times this individual reported single occasions of consumption for items from this food group (the  $C_{i,o,k}$  in equation (5)). In the later case, a high number of values of contamination are drawn within the same individual at each iteration, and  $C_{i,o,k}$  finally fluctuate around the food group mean ( $C_k$ ), leading to lower high percentiles estimates. This explains why we find parameters estimates much alike those calculated through a deterministic model (data not shown) when 'inputting' the same sample of individuals as for

Monte-Carlo simulation.

To our knowledge, this is the first time this aspect of the exposure model structure is brought to light. For instance, as for the literature related to other contaminants we browsed, Tressou et al. (2004) implicitly used the 'Week' time-window to simulate exposure to OTA, sampling consumption baskets calculated as the mean of seven days of food records. Yet, the distinction between at least two different time-windows in the implementation of sampling plans for contamination values is justified by and may be interpreted in the light of underlying hypothesis about food supply, consumer choices (such as brand loyalty) or storage habits among the group of consumers under study. Such questions as: Where do people buy their food? How often? Are they faithful to specific food brands? Do these brands exhibit specific patterns of contamination compared to other brands? Are raw commodities stored at home? How long and under which conditions? All possibly relate to country-specific profiles of food supply and consumer choices. As an example, the influence of introducing indicators of market shares (the proportion between the level of consumption of a specific brand and that of all brands of the same products in the studied population) and brand loyalty (the consumer's tendency to repeat the purchase of a brand) in the probabilistic modelling process was studied by Arcella et al. (2003). Taking intense sweeteners as an example, they found that the distribution of intakes in an Italian teenager population may be fairly different depending on the hypothesis formed in relation to the availability of data for market share and brand loyalty, especially as far as higher percentiles were concerned. Imposing a high level of brand loyalty on subjects was a conservative assumption by increasing the probability of cases in which high consumers always consume the same brands, including those with the higher concentration of chemical substances. Although we did not have any quantitative information either as to how OTA levels vary according to brand or about consumers' choices and habits, by considering different time windows for sampling contamination data we clearly referred to the above-mentioned issues, and more broadly speaking to food market structure and consumer behaviour.

Attempting an interpretation of the different time-windows explored in the present paper with the afore mentioned prospect, we believe the 100% dependence between contamination values within food groups, which is at stake in the 'Week' scenario, would imply that individuals buy the same type of products (same general description and even same brand(s)), possibly at the same retail location, and that these products show a low variability in their toxin content within a given location - due to raw commodities origin, storage and/or processing, including recipes and technological transformation - or within an individual diet - due to home storage habits. This could best describe a rural-type economy, with time-persisting geographical or individual differences in the safety of food supplied. There actually tends to be few foods, especially processed foods, in the marketplace in most Third World countries, although outside rural areas, there is a tendency to food diversification that comes along urbanization. Alternatively, the stability of chemical levels in foods could correspond to intentionally added substances that are part of the composition of processed foods and may vary from brand to brand while remaining constant within a brand due to fixed recipes. Where consumers are loyal to brands, this could reflect constant levels of the chemical encountered with the 'Week' scenario.

On the other hand, assuming 100% independence between contamination values within food groups, as considered in the 'Occasion' scenario, would suggest that people buy a lot of different food products across and within food groups, which has to do with food diversity (Thiele S. and Weiss C. 2000) and dietary variety (Drewnowski et al. 1997). Western

countries are indeed characterized by a large degree of food or dietary heterogeneity, even though there is relatively little nutrient variability. These products would furthermore be supposed to experience a certain range of contamination levels, possibly depending on brand, or within a brand depending on raw ingredients, storage, recipe and processing. As stated above, the importance of food brands and market shares on the level of exposure to food chemicals has been exemplified in the case of intense sweeteners for which the type and quantity of chemical substance shows a wide variation from brand to brand (Arcella et al. 2003; Leclercq et al. 2003). Even if we do not know how much it could account for OTA variability, and the effect is likely to be, in essence, far less significant than with some additives, micronutrients or pesticides residues that are likely to be present in some brands and not in others, it could be an interesting factor to investigate in further research about the occurrence of OTA in foods. Related to this topic is that the wider the range of retail locations the more varied the consumer choice about type of products and brands – which refers to food purchase diversity (Jekanowski M.D. and Binkley J. 2000). A country where a wide variety of food products are marketed by different brands and sold at a wide range of retail locations would best describe a composite agri-food system within a liberal economy characterized by a highly competitive food market and complex determinants of consumer choices.

The French food market and purchase characteristics can reasonably be considered of that type (Chardon O. and Dumartin S. 1998; Eymard I. 1999; Larmet G. 2002; Le Bihan G. and Roques N. 2004). Thus, in addition to recommending non-parametric distributions for contamination data, we further advocate the use of the ‘Occasion’ rather than the ‘Week’ time window for sampling contamination values in the case of the assessment of dietary exposures among the French population.

### IV.3 Input data validity

#### IV.3.1 Consumption data

In the present study, we made two main assumptions about consumption data that we inputted in the models. First, we assumed that the INCA sample of French adults (aged 15 and over) is representative of the French adult population, which sounds reasonable since stratification and the quota method were implemented. It is nevertheless important to bear in mind that 511 ‘under-reporters’ out of 1985 originally included participants were excluded from our analysis, which corresponds to a 25.7% ‘exclusion rate’. Indeed, a quick view at the individual characteristics of this group showed a clear tendency among higher body mass index (BMI) groups to under-report total energy intakes (data not shown), as previously stated and evidenced (Lichtman et al. 1992). As long as total exposure is ‘corrected’ for body weight on an individual basis, these individuals could potentially bias the estimates of exposure distribution in the direction of under-estimation (lower food intakes due to under-report divided by higher body weight). The relation between BMI and under-reporting has nevertheless recently been re-evaluated in the light of other factors such as dietary restraint and socio-economic status (Hill and Davies 2001; Lara et al. 2004), which was not tested here. The exclusion of those subjects from our study sample could have introduced some level of bias in the sample composition, depending on the most under-reported foods and their implication as OTA vectors. Moreover, energy under-reporting did not influence estimate of food additive intakes at upper percentiles in a previous study (Lambe J. et al. 2001), questioning the relevance of excluding energy under-reporters from exposure assessment studies on a systematic basis. Please note that the method used allows the identification of major energy under-reporters but not of all of energy under-reporters. Moreover, identification of food specific under-reporting is not feasible in large epidemiological studies.

Secondly, we assumed that the available number of days of food records (e.g. seven) was representative of a longer period (e.g. several months), which would allow us to characterize within-individual variability of food intakes so that the between-individuals variability is not obscured. This is an important issue as a short survey duration usually leads to an over-estimate of the prevalence of low and high intakes as well as a low precision in means estimates (Beaton et al. 1979). We made this assumption on the basis of calculations at the population level which showed that a seven-day period accounts properly for between-persons variance in OTA intakes, since it allows correcting for the effect of within-person variance (Council É. et al. 2005b).

#### IV.3.2 Contamination data

As far as contamination is concerned, representative data of adequate quality are required to secure the validity of the outputs of the stochastic approaches. We assumed that the samples of foods analyzed for OTA were representative of the food groups to which they belong, that is sampling error is low, which we could not check in any way, since contamination data were provided by the Ministry of Agriculture and the Ministry of Economy and Finances with little more additional information than limit of detection and quantification. Although analytical error cannot be ruled out, the sampling step usually is the largest source of error along the test procedure steps, due to the extreme mycotoxin distribution among kernels in the lot, as proved for aflatoxins in peanuts (Whitaker 2003). Another issue of potential significance stems from the analysis of composite samples, the mean contamination of which is taken as an integrative value over several units. For some food commodities, the consumer eats only a small number of units per day compared with those of the composite sample, which may influence the output of probabilistic models as evidenced for pesticide residue concentrations (Cárcamo J. and Ocio Armentia J.A 2001). However, this situation is more likely to occur with pesticides in fruits and vegetables that clearly experience a unit-to-unit variability than with OTA occurring in rather homogenous cereal-based products. Moreover, the problem is of relevance only when acute exposure assessment is considered, that is not our intention.

Given that statistical modelling does not put up well with scarce and invalid data, efforts should be constantly implemented to improve the overall quality of input contamination data (relevant, representative, precise and accurate) unless some level of 'expert judgment' is introduced in the process, for instance through a Bayesian approach (Carlin et al. 2000; Jensen J. 1996; Spiegelhalter D.J. et al. 1993).

#### IV.4 Model validity

None of the alternative models we proposed, which all have a similar basic structure but different input distributions and time-window for sampling, could be validated *per se*. The validation of a model actually requires the availability of a 'gold-standard' measurement estimating 'true' intakes, such as a duplicate-diet study (Gibney and van der Voet 2003), or the implementation of more sophisticated statistical approaches such as the triads method that compares three types of measurements, one of which has random errors independent from the two others (Ferrari et al. 2000; Kaaks et al. 2002). The 'validity criteria' we use to select the NP-O model as best-fitting the French situation is thus essentially qualitative and relies, as far as the time-window is concerned, on strong assumptions as to how variable are the levels of contamination encountered in our sample of adult individuals (see sections 4.1 and 4.2). Although we acknowledge that a worst-case-scenario allows obtaining conservative intake distributions, as the P-W and NP-W scenarios may be looked upon, our primary objective was to draw attention on more 'realistic' means of modelling exposure to OTA in the French population, especially as far as higher percentiles are concerned.

## IV.5 Comparing output distributions to tolerable daily intakes

Comparing our results to absolute levels of OTA exposure simulated in other studies is made difficult by the sensitivity of the output to the underlying model assumptions. Apart from the distributional and time-window scenarios we mentioned earlier, one of the main differences we noticed while trying to relate our results to previously published data is that, even when raw consumption and contamination data sets are, if not the same, highly comparable, the distribution of exposures vary dramatically depending on the effort put into converting foods 'as consumed', for which individual information about quantities is recorded, into foods at the 'raw edible level', which usually corresponds to the level at which contamination data are available. The situations observed in published literature varied from the use of no recipes at all (Tressou et al. 2004) - which tends to over-estimate exposures -, to simple percentages of dry matter for cereal-based products (Verger P. et al. 1999) - which tends to under-estimate exposures -, and complex recipes - which tries to approach as accurately as possible the true composition of the diet (present results). The later effort inevitably encounters similar problems as those described for the development of food composition databases (Greenfield H. and Southgate D.A.T. 1992; Ireland et al. 2002). Systematic and random errors in food composition databases may bias (non-)nutrients intake estimation and make them incomparable at international level, altogether leading to wrong public health measurements and conclusions, as for the comparison of exposures to tolerable daily intakes (TDI) or the relation between diet and disease. Recipes and conversion factors development should thus be an important task in the effort to improve the assessment of exposures to food chemicals.

The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA 2001), basing its recommendations on the nephrotoxicity of OTA, proposed a Provisional Tolerable Weekly Intake (PTWI) of 100 ng/kg b.w./week, approximated by a TDI of 14 ng/kg b.w./day. Choosing the NP-O scenario as best fitting the French situation, our results show a null probability of exceeding this TDI in the French population. In the meantime, the Scientific Committee on Food of the European Commission recommended (Scientific Committee on Food 1998) to reduce OTA exposure below 5 ng/kg b.w./day following the Working Group of the Nordic Council of Ministers that based its opinion on carcinogenicity data (Olsen M. et al. 1991). In that prospect, our results with the NP-O model indicate a probability of exceeding TDI amounting to one in a hundred or so. If we had looked at another scenario, we would have found a (much) higher percentage of individuals susceptible to exceed TDI, illustrating how cautious the choice of a model and interpretation of its outcomes in terms of risk characterization should be.

## V CONCLUSIONS

Our results suggest that the time-window strongly acts upon the estimate of exposure variability, especially as far as higher percentiles are concerned, the 'Week' models leading to more variable (wider-spread) and more positively skewed exposure distributions compared to the 'Occasion' models. Considering the relative scales of uncertainty reported here as shown by the range of parameters values (95%CI), our results support the conclusion that uncertainty is more dependant on time window used for sampling contamination values (which deals with model structure) than on the (non-)parametric nature of contamination CDFs (that deals with input variability and the uncertainty surrounding it).

In the framework of exposure assessment of the French population to food contaminants, we recommend the use of the non-parametric model coupled with the 'Occasion' time-window for sampling contamination values within a probabilistic modelling scheme, at least whenever

disaggregated consumption data are available. We further advocate running a range of scenarios (NP-W, P-W, NP-O, P-O) so as to give a broader picture of how exposure may vary according to different underlying assumptions about consumer behaviour, food market specificities and factors responsible for the fluctuation of contamination levels. Nevertheless, in case of extremely scarce data – that is high uncertainty around contamination data – we would recommend the use of deterministic rather than probabilistic model that tend to over-estimate exposures, especially when implemented with parametric distributions as input.

## PARTIE 2:

### FITNESS-FOR-PURPOSE OF DIETARY SURVEY DURATION: A CASE-STUDY WITH THE ASSESSMENT OF EXPOSURE TO OCHRATOXIN A.

#### I INTRODUCTION AND OBJECTIVES

##### I.1 Survey duration as fitting study goals

Many studies have demonstrated that the duration of food consumption survey may have a marked effect on estimates of nutrient intakes. This is a result of the high degree of within-person variability, and primarily on a day-to-day basis, which exists in food intakes in both individuals and groups (Basiotis et al. 1987; Beaton et al. 1979; Freudenheim et al. 1987; Liu et al. 1978; Nelson et al. 1989; Sempos et al. 1985).

The effects of short survey duration include: (1) low precision in estimates of usual intakes - the centre of the between-person intakes distribution is less-precisely pin-pointed; (2) over-estimation of the prevalence and absolute levels of low and high intakes - the extremes are pushed out further from the center of the true between-person distribution of habitual intakes; (3) misclassification of individuals according to their relative usual intakes; and (4) low accuracy of individual usual intakes estimates (Gay 2000; Willett W. 1998).

The appropriate duration of a survey can only be appreciated on the basis of the purpose for collecting food consumption data. Obviously, the first and second impacts - (1) and (2) - have to do with the assessment of intakes at the group level, as for nutritional surveillance aiming at formulating public health recommendations at the population level through comparison to Recommended Dietary Allowances (RDA). The third aspect (3) is one of ranking individuals enrolled in an epidemiology study into groups of intakes - either third, quartiles or other quantiles -, as is often done in case-control studies. And the last situation (4) deals with the quantitative assessment of an individual's true intake, either for medical advice purpose - as with dietician consulting -, or in the framework of a prospective cohort study on the association between some nutrient intakes and a particular health outcome, or else in a cross-sectional study aiming at relating individual intakes to individual biological parameters such as biomarkers of adverse or beneficial effects. In all of these frameworks, either population- or individual-focused, nutritionists aim at measuring something called 'usual' daily intake, that we define as 'long-run daily average', where 'long-run' is effectively a year.

##### I.2 Lack of transposition from nutrient to non-nutrient intakes

The afore mentioned issues have been extensively studied in the field of nutritional epidemiology. A wide range of results were published about nutrients (Grunwald et al. 2003; Palaniappan et al. 2003; Willett W. 1998) and more recently, about foods (Carriquiry 2003; Lambe et al. 2000). Yet, it is striking that the question was rarely - if ever - addressed in the case of non-nutrients such as food chemicals, although those exposures occur through the diet and are usually estimated from the same food consumption surveys as those dedicated to nutritional purposes. Of course, the question of 'optimal' survey duration as a function of study goals is relevant both for nutrients and other dietary exposures, such as food additives, pesticides residues, environmental contaminants, packaging-material migrants or mycotoxins. The present study thus aims at introducing those involved in food chemicals exposure assessment to (or reminding them of) relatively simple and well established methods

borrowed from the field of nutrient intakes assessment. This work is focused on the estimation of relevant number of days of food records as a function of the research purpose, which we call ‘fitness-for-purpose’ following Lambe J. (2002).

We choose the food mycotoxin ochratoxin A (OTA) as an example in order to complement recent methodological works on the influence of input variability (contamination data) and model structure (time-window for its handling in a probabilistic modelling scheme) on exposure estimates (Council É. et al. 2005a).

Briefly, OTA is a secondary metabolite of fungi such as *Penicillium verrucosum* and *Aspergillus ochraceus* that occurs in a number of food commodities like cereals, coffee, dried fruit, pulses and beans as well as in animal products by transfer through contaminated feeds (Pittet A. 2001). OTA is nephrotoxic in experimental studies and has been classified as a possible human carcinogen (group 2B of the IARC classification) on the basis of its potent renal carcinogenicity in the male rat (National Toxicology Program 1989). Hence the concern it raises in the food safety arena, even though no clear association with any human renal disease could be evidenced yet (Bozic et al. 1995).

## II MATERIALS AND METHODS

### II.1 Input data description

#### II.1.1 Contamination data

Please refer to part 1 paragraph II.1.1 and table 1 for a description of contamination data.

#### II.1.2 Consumption data

Please refer to part 1 paragraph II.1.2, tables 2 and 3 for a description of consumption data. Please note that subjects with less than 7 days of food records were further excluded for the analysis comparing the use of 1, 3 and 7 days of food records, resulting in a sub-sample of 1416 individuals.

### II.2 Exposure modelling

#### II.2.1 General exposure model

The general exposure model used to assess intakes from the diet can be considered as consumption X concentration = dietary exposure. Please refer to equation (1) (part 1 paragraph II.2.1).

#### II.2.2 Deterministic exposure model

The deterministic approach is characterized by the assumption that contamination levels experienced by all individuals are constant within a food group and during the study period. The ‘point-estimate’ for this fixed value of chemical concentration usually is the mean contamination level  $C_k$  observed within food group  $k$ . It is a surrogate for the real (unknown) long-term average contamination level that every individual of the study sample encounters daily through the consumption of food items belonging to this food group. On the other hand, we used the extensive consumption data set, taking into account the variability that exists in food consumption patterns. The deterministic model can be written as follows (equation (1)):

$$E_i = \frac{1}{n_i} \sum_{j=1}^{n_i} \sum_{k=1}^{13} \frac{Q_{i,j,k} \cdot C_k}{bw_i} = \frac{1}{n_i} \sum_{j=1}^{n_i} E_{i,j} \quad (1)$$

With the same legend as equation 1 except that  $C_k$  is the average contamination of food group  $k$  ( $\mu\text{k}/\text{kg}$ ).  $E_{i,j}$  is the exposure of individual  $i$  on day  $j$ .

To estimate mean contamination levels ( $C_k$ ) from data sets with variable proportions of values below the limit of detection (LOD), we followed WHO recommendations established in the framework of GEMS/FOOD-Euro (1995). The proposed surrogate values to be used in place of non-detects are according to their prevalence:

- $\leq 60\%$  non-detects: use  $LOD/2$ ;
- $> 60\%$  non-detects: use zero and LOD in two separate estimations of the mean.

We chose to implement a ‘Zero and  $LOD/2$ ’, deterministic model (D.Z.), where non-detects were replaced with zero for food groups with more than 60% non-detects and  $LOD/2$  for others. By analogy, values lying between LOD and LOQ (limit of quantification) were replaced with  $(LOQ+LOD)/2$ .

### II.2.3 Data transformation, variance decomposition and variance reduction

Nusser et al. (1996) proposed a statistical method to estimate usual intake distributions by short-term measurements (repeated recalls) allowing to reduce the variance of individual means by eliminating the intra-individual variance component. Hoffmann et al. (2002) subsequently considered a simplified Nusser method (S-Nusser) in which the computational effort is trimmed. The S-Nusser method we implemented was extensively described by Hoffmann et al. (2002). It basically consists of four steps:

1. *Transformation*: the short-term measurements  $X_{ij}$  ( $E_{ij}$  in equation (1)), where  $i$  denotes the individual and  $j$  the day of food record, are transformed to approximate a Gaussian distribution. We used the D.Z. model (equation (6)) to estimate the distribution of OTA intakes, and then transformed the exposure data through two-parameter Box-Cox transformation (Box G.E.P. and Cox D.R. 1964). In short, the transformation function  $f$  takes the form shown in equation (2):

$$f(E) = f_{\tau,\omega}(E) = \begin{cases} ((E + \omega)^\tau - 1)\tau^{-1} & \text{if } \tau \neq 0 \\ \ln(E + \omega) & \text{if } \tau = 0 \end{cases} \quad (2)$$

Where  $E$  is the exposure under study,

$\tau$  is the power parameter,

$\omega$  is a scale parameter ensuring that the back-transformed intakes have the same central tendency as the original data.

The parameter values for  $\tau$  and  $\omega$  are determined by maximizing the Shapiro-Wilk statistic, the most applied statistic to test the hypothesis of an underlying normal distribution. We called a SAS<sup>®</sup> Macro provided by Hoffmann and colleagues (Hoffmann et al. 2002) to assess parameters values.

2. *Variance decomposition*: the total variance is split into between-individuals ( $S_b^2$ ) and within-individual ( $S_w^2$ ) variance components through ANOVA. Generally, the data transformation not only renders the inter-individual distribution approximately normal, but also stabilizes the intra-individual variance (Box G.E.P. and Cox D.R. 1964). Thus, the two model assumptions of the classical measurement model, normal distribution and equal intra-individual variances, should be approximately fulfilled in the transformed scale. We used transformed OTA intakes distribution as input and implemented a mixed model that adjusted for gender as a fixed effect (SAS<sup>®</sup> VARCOMP procedure).
3. *Variance reduction*: the usual intake of the  $i^{\text{th}}$  individual in the normal scale ( $\hat{T}_i$ ) is estimated by equation (3) that corrects for the within-person variance component:

$$\hat{T}_i = \sqrt{\frac{\sigma_{\bar{X}}^2 - \sigma_{\varepsilon}^2}{\sigma_{\bar{X}}^2}} \frac{1}{k} [\bar{X}_{i.} - \bar{X}_{..}] + \bar{X}_{..} \quad (3)$$

Where  $\hat{\sigma}_{\bar{X}}^2$  is the empirical variance of the intake under study,  
 $\sigma_{\varepsilon}^2$  is the error variance estimated by within-individual variance component  $S_w^2$ ,  
 $k$  is the number of days of food record available per person,  
 $\bar{X}_{i.}$  is the mean intake of individual  $i$  over  $k$  days of food record,  
 $\bar{X}_{..}$  is the grand mean.

4. *Back-transformation*: individual intakes  $\hat{T}_i$  are back-transformed to the original scale, taking account of a measurement error term  $\varepsilon$  that includes day-to-day variations as well as random measurement error;  $\varepsilon$  is normally distributed, with zero mean and variance  $\sigma_{\varepsilon}^2$  (see Hoffmann et al. (2002) for mathematical developments) estimated by  $S_w^2$ .

#### II.2.4 Estimation of number of days as a function of desired correlation or precision

When the aim of a study is to rank individuals according to their intakes, that is to correctly classify subjects into groups of exposure, then the number of days required can be calculated as a function of the desired level of correlation ( $r$ ) between observed and true intakes (equation (4), (Nelson et al. 1989)):

$$n = \left[ \frac{r^2}{(1-r^2)} \right] \times \frac{S_w^2}{S_b^2} \quad (4)$$

Where  $n$  is the number of days needed per person,  
 $r$  is the unobservable correlation between observed and true mean intakes,  
 $S_w^2$  is the within-person variance for the intake under study,  
 $S_b^2$  is the between-persons variance for the intake under study.

The correlation coefficient  $r$  expresses the accuracy of ranking and can be interpreted in terms of the proportion of subjects correctly classified in the top or bottom segments of the distribution of intakes (Nelson et al. 1989).

Now, if the aim is to estimate an individual's true usual intake, the number of days needed to get a specified degree of precision or relative error  $A(\%)$  can be calculated following a formula proposed by Beaton and colleagues (1979) and rearranged by Willett (1998) (equation (5)):

$$n = \left[ \frac{Z_\alpha \times CV_w}{A} \right]^2 \quad (5)$$

Where:  $n$  is the number of days needed per person,  
 $Z_\alpha$  is the normal deviate for the percentage of times  $(1-\alpha)$  the measured value should be within  $A\%$  of the true (unknown) value; here  $\alpha=0.05$  and  $Z_\alpha=1.96$ ,  
 $CV_w$  is the within-person coefficient of variation for the intake under study,  
 $A$  is the targeted level of relative error (%).

In this framework and following Basiotis et al (1987), a 'precise' estimate is defined as a  $n$ -day average of intakes being within  $A\%$  of the 'true' average intake of the individual 95% of the time.

As a matter of confirmation of the validity of our method, we also applied data transformation, variance decomposition and estimation of relevant number of days to nutrients for which an extensive literature has been published. Energy, protein, carbohydrates, lipid, vitamin C, vitamin E, beta-carotene and calcium intakes were assessed from the INCA survey consumption data set described above.

## II.2.5 Probabilistic approach

### Probabilistic exposure model

In the probabilistic approach, contamination is not regarded as constant and average as in the deterministic scenario, but varies instead, from individual to individual, and from one occasion of consumption to the other, following previous work on the handling of contamination variability. The model still can be described as in equation (1), with  $C_{i,t,k}$  sampled according to the 'Occasion' time-window from non-parametric cumulative distribution functions (CDFs). Details pertaining to the probabilistic exposure model depending on time-window, the development of non-parametric distributions of contamination by food group as well as the principle of Monte-Carlo simulations have been fully described in a previous paper (Counil É. et al. 2005a).

## Simulation of contamination variability with three and seven days of food records

We estimated individual exposure distributions through first-order Monte-Carlo simulation (MCS). A simulation runs 10 000 iterations. At each new iteration,  $C_{i,t,k}$  are drawn randomly from empirical (non-parametric model) cumulative distribution functions.  $Q_{i,t,k}$  are constant through the simulation. Each iteration give one estimate of mean exposure  $E_i$  for each individual in the sample. An estimate of the mean of individual exposure is then derived from the 10 000 exposure values simulated for each individual.

We ran the simulation with two different consumption data sets: one with seven days of food records, the other with only three non-consecutive days, comprising two week-days and one week-end day, drawn at random from the seven days available for each individual. This was done in order to characterize the influence of survey duration on the classification of persons into quartiles of exposure.

### Agreement between classifications of individuals into quartiles of exposure

In order to assess the agreement between classifications of individuals into quartiles of exposure to OTA based on Monte-Carlo simulation performed either with three or seven days of food records, we calculated weighted kappa coefficients (Cohen J. 1968; Fleiss J.L. 1981). Weighted kappa coefficients allow for differential weighting of disagreement in ordered categories and thus are preferable to simple kappa (Cohen J. 1960) that distinguishes only between agreement and disagreement cases. We also computed a measure of correlation between these two 'raters' through the polychoric correlation coefficient, which is just a special case of latent trait models when there are only two 'raters' (Drasgow F. 1988). Those measures of agreement and correlation were estimated through the SAS<sup>®</sup> FREQ procedure.

## III RESULTS

### III.1 Distribution of exposures to Ochratoxin A in the general population

#### III.1.1 1, 3 and 7 days of food records

Table 1 describes exposure distributions estimated through 1, 3 or 7 days of food records using the D.Z. model (equation (1)). Comparing those three scenarios, we notice that central tendency is hardly affected, which is in line with results published in nutritional epidemiology (Freudenheim et al. 1987), whilst dispersion parameters, both absolute and relative, clearly decrease when the number of days increases from 1 to 7. Indeed, standard deviation (S.D.) and coefficient of variation (C.V.) respectively decline from 1.17 to 0.90 ng OTA/kg b.w./day and from 72.1 to 53.2% when using 7 instead of 1 day of food records, while the inter-quartile range (I.Q.R.) lowers from 1.16 to 0.97. In the meanwhile, the right tail of the distribution is heavier with 1 than with 7 days, as shown by high percentiles (P97.5 falling from 4.76 down to 3.85 ng OTA/kg b.w./day) and asymmetry (skewness falling from 2.4 down to 2.1). And lower percentiles (P5 and P25) increase with the number of repetitions.

Number of days	Mean	SD	CV(%)	IQR	Range	P5	P25	Median	P75	P95	P97.5	%≥TDI
1 day	1.62	1.17	72.1	1.17	10.08	0.43	0.86	1.34	2.02	3.88	4.76	1.77
3 days*	1.70	0.96	56.7	1.05	10.00	0.63	1.06	1.48	2.11	3.57	4.12	1.13
7 days	1.69	0.90	53.2	0.97	9.21	0.66	1.08	1.48	2.06	3.44	3.85	1.06
S-Nusser**	1.69	0.86	50.8	0.91	8.84	0.70	1.12	1.51	2.03	3.28	3.74	0.01

\* Combination of two non-consecutive week days and one week-end day; \*\*Reduction of variance applied to individual means calculated from 7 days of food records; CV: coefficient of variation (%); IQR: inter-quartile range; %≥TDI: proportion of the population experiencing exposure levels larger than or equal to the SCF recommended level for OTA called tolerable daily intake (TDI) and fixed at 5 ng/kg b.w./day.

**Table 1:** Distribution of dietary exposure to OTA (ng/kg b.w./day) estimated with 1, 3 and 7 days of food records and through variance reduction.

These results emphasize that, as expected, the more days of food records used in the deterministic approach, the more precisely the center of the distribution is pin-pointed and the less the extremes are pushed out further from the center of the true between-person distribution of intakes. Extending the duration of the survey is actually known to average out the effects of within-person variation in nutrient intakes (Gay 2000), which holds true for non-nutrients. This is done by ensuring a reduction in the ratio of within to between-variance components, that is to say an increase in the relative amount of signal (between-individuals variability) to noise (within-person variability, including day-to-day variation and measurement error). On the other hand, a mean of one day intakes by individuals in a group can be an unbiased estimate of the group's usual mean intake provided that those single days are a good representation of all days of the week and season of the year (Guenther et al. 1997). Noticeably, using 3 days of food records seems to bring similar benefits as the 7 days scenario, thus at lower cost and constraint.

### III.1.2 Correction of individual mean exposures for within-person variance

Results of the variance reduction operated through the S-Nusser method are shown in table 1. Formally, the distribution can be considered as an estimate of the sample distribution of 365-day means (Hoffmann et al. 2002) that we call 'usual daily intake'. As expected, we observe a further decline in standard deviation and coefficient of variation whilst lower percentiles (P5 and P25) increase and upper percentiles (P75, P95, P97.5 and P99) decrease, as compared to any number of food records. Arithmetic means remain almost constant over the different data sets. In the meanwhile, the proportion of people experiencing exposure levels higher than or equal to 5 ng OTA/kg b.w./day - the Tolerable Daily Intake (TDI) recommended by Scientific Committee for Food (SCF, 1998) - drop from 1.77% to less than 1% when switching from 1-day to S-Nusser method. Similar stability in arithmetic mean, decrease in higher percentiles and changes in proportions of the population meeting recommended intake levels were observed for fat (Guenther et al. 1997; Hoffmann et al. 2002), folate and vitamin A (Guenther et al. 1997) as well as vegetable (Hoffmann et al. 2002) when implementing comparable variance reduction approaches for the estimation of usual intakes from short-term measurements. It is here important to note that these approaches do not estimate usual dietary intake distributions for specific individuals.

## III.2 Classification of individuals into quantiles of exposure

### III.2.1 Number of days to get a r correlation between observed and true OTA intakes

The  $S_w^2/S_b^2$  ratio ranges from 0.84 for the male group to 1.01 for the female group, the whole population averaging at 0.93. Results of number of days calculated from equation (4) are presented in table 2. With a 7-day food diary, a 0.94 correlation is expected between observed and true OTA intakes, which is quite acceptable.

Correlation (r)	Whole population	Male	Female
0.70	1	2	1
0.80	2	3	2
0.85	3	4	3
0.90	5	6	5
0.95	9	11	10
0.99	46	59	49

**Table 2:** Number of days of food record needed to obtain a specified level of correlation (r) between observed and true OTA intakes

Results pertaining to nutrients intakes are quoted in table 3. The orders of magnitude of within- to between-persons variance ratio and estimated number of days of food records to achieve accuracy and precision are in line with published papers (Basiotis et al. 1987; Beaton et al. 1979; Nelson et al. 1989; Sempos et al. 1985; Willet 1998; (Mennen et al. 2002); Palaniappan et al. 2003).

Nutrient	$S_w^2$	$S_b^2$	$S_w^2/S_b^2$	$CV_w(\%)$	10%(d)	20%(d)	0.80(d)	0.90(r)
Energy	0.050	0.026	1.91	2.84	1	1	4	9
Protein	0.070	0.028	2.51	5.64	2	1	5	11
Carbohydrates	0.048	0.042	1.15	3.84	1	1	3	5
Lipid	0.077	0.028	2.79	5.87	2	1	5	12
Vitamin C	2.927	1.846	1.59	27.2	29	8	3	7
Vitamin E	0.213	0.068	3.13	23.7	22	6	6	14
Beta-carotene	1.069	0.277	3.86	14.1	8	2	7	17
Calcium	0.313	0.217	1.44	5.53	2	1	3	7

$S_w^2$ : within-person variance component;  $S_b^2$ : between-persons variance component;  $S_w^2/S_b^2$ : variance ratio;  $CV_w$ : intra-individual coefficient of variation; 10%(d): number of days needed to achieve a relative level of error of 10% in the estimation of individual intakes; 0.80(d): number of days needed to get a 0.80 correlation coefficient between observed and true mean intakes.

**Table 3:** Variance components and number of days of food record needed for specific nutrients.

### III.2.2 Exposure classification with three or seven days in a MCS design

Comparing the classification of individuals into quartiles of exposure to OTA based on Monte-Carlo simulation with either 3 or 7 days of food records, we find that 68.8% of persons are ranked in the same quartile of exposure while 29.7% are classified in an adjacent quartile of exposure, equally shared between higher and lower exposure groups. This corresponds to a 0.92 polychoric correlation coefficient, a 0.58 simple kappa coefficient, and a 0.74 weighted kappa coefficient between the two classification systems. According to Krippendorff (1980), this allows tentative conclusions about the ‘quality’ of agreement while following Rietveld and van Hout (1993) criteria it would represent ‘substantial’ agreement.

This is in accordance with results from Karreck (1987) who showed that at least three 24h recalls were required to classify 80% of the population into tertiles of nutrient intake.

### III.3 Assessment of individual intakes

We find a greater intra-individual coefficient of variation in the female gender group ( $CV_w=79.5\%$ ) than in the male group ( $CV_w=59.8\%$ ), the whole population  $CV_w$  adjusted for gender being intermediate ( $CV_w=69.2\%$ ). Our results show that the number of days needed to estimate a person’s true OTA intake clearly rockets exponentially while targeting sharper precision, reaching a peak at 18 375 days to achieve a 1% level of precision. More realistically, table 4 quotes some landmarks calculated from equation (5). Noticeably, given the 7 days we have in hand, we could not, at best (one-parameter Box-Cox transformation), expect a precision better than 33% in the estimate of an individual’s OTA intake. Instead, reaching a 10% precision level would require at least the availability of 74 days of food records, which is simply beyond practical possibilities.

Error (%)	Whole population		Male		Female	
	BC(1)	BC(2)	BC(1)	BC(2)	BC(1)	BC(2)
5	296	735	245	551	352	971
10	74	184	61	138	88	243
20	19	46	15	35	22	61
30	8	21	7	16	10	27
40	5	12	4	9	6	15
50	3	8	3	6	4	10
90	1	3	1	2	1	3

*BC(1)*: one-parameter Box-Cox transformation ( $\tau=0.23$ ,  $\omega=0$ ). *BC(2)*: two-parameters Box-Cox transformation ( $\tau=0$ ,  $\omega=0.28$ ). See equation (3) for parameters details.

**Table 4:** Number of days of food records needed to estimate a person’s true OTA intake with a specified relative error with a 95% level of confidence.

## IV DISCUSSION

### IV.1 Characterizing the distribution of exposures in a population

We investigated the influence of the number of days of food records on the estimate of OTA intakes distribution. Our results emphasize that the more days of food records are used in the deterministic approach, the narrower the distribution of OTA intakes is, particularly for higher percentiles; in other words, precision increases. This is in accordance with research carried out on the reduction of intra-individual variance according to survey duration and the subsequent importance of taking the average of multiple measurements by subjects when the total sample size is limited by cost or practical considerations (Volatier et al. 2002) in order to counter-balance the tendency for within-person variation to artificially extend the tails of the intake distribution.

Noticeably, using 3 days of food records seems to bring similar benefits as the 7-day scenario, thus at lower cost and constraint. This is in agreement with recommendations about the duration of food surveys aimed at exposure assessment (IEFS 1998), as long as a combination of two week days and one week-end day is used for the analysis, as we implemented here. Indeed, comparisons of random week-end and week-day samples confirmed that failure to proportionately sample both will bias the estimation of the usual intake as well as the within-subject variance (Tarasuk and Beaton 1992). Gay (2000) also showed that increasing the recording period from 2 to 4 to 7 days gained only a small increase in the precision with which mean intakes were estimated. Grunwald et al. (2003) lately evidenced that the greatest gains in precision were seen over the first few measurement days. Willet (1998) pointed out that the estimation of within-person variation requires at least 2 daily measurements per individual which altogether maximizes the size of the study sample and reduces the length of the confidence intervals for the percentiles. Hoffmann et al. (2002) consistently recommended using two sampling days provided that: (1) they are non-consecutive, (2) total number of days is sufficiently large and (3) covers all seasons and days of the week and (4) proper statistical estimation procedures based on short-term measurements are then implemented, as with the S-Nusser method which proved to be efficient in the case of OTA. Condition (1) follows from that adjacent days may result in over-estimation of population variance and under-estimation of intra-individual variance if intakes vary patently across seasons.

The issue of right tails estimation is of particular relevance for food chemical exposure assessments where the parameters of interest are at the extremes of the exposure distribution rather than at the center. Higher percentiles are indeed compared to levels of intakes considered as safe on a life-long and daily basis, such as Tolerable Daily Intake (TDI) or Acceptable Daily Intake (ADI). We showed that applying the S-Nusser variance reduction method resulted in less than one percent of the French adult population whose exposure to OTA amounts to or exceed the SCF TDI, whilst the one-day distribution of exposure would have lead to 1.8% of persons exceeding TDI, which is not negligible. These results demonstrate the effects of not removing within-person variation on the outcome of risk assessment, which may significantly influence risk management options. The question as to whether non-normal data should be transformed to reduce skewness prior to variance decomposition has been recently raised by (Jahns et al. 2004) who discussed the potential bias introduced by the back-transformation process. Since we introduced an error term so as not to perform a 'naïve' back-transformation, we believe that our results are robust, especially since the mean intakes estimated through back-transformation equals the mean of the raw (untransformed) distribution (see table 1).

## IV.2 Estimating individual intakes

We calculated the number of days of food records needed to estimate a person's true intake with a specified degree of precision. To do so, we estimated the within-person variation component from seven consecutive days of food records. Yet, Larkin et al. (1991) suggested that random-day samples may be preferable for describing dietary intake of individuals since adjacent-day samples tend to underestimate true within-subject variation (Tarasuk et Beaton 1992), which might be a limitation of the present study.

We did not find in the literature results pertaining to intra-individual variance of contaminants intakes and their impact on error in individual exposure assessment. However, our findings (table 4) are in line with previously published works in the field of nutritional epidemiology both for nutrient and food intakes (Basiotis et al. 1987; Palaniappan et al. 2003). In general, the minimum number of days required for estimating individual usual intake ranges from 3 to 10 days for energy and macronutrients, whereas 20-50 days are needed for food components with large day-to-day variation, such as cholesterol and vitamins A and C (Buzzard M. 1998), and even more for food groups due to high within/between subjects ratios (Palaniappan et al. 2003). The difference in within-subject variance between nutrients largely depends on the food sources for each specific nutrient. Nutrients found in most foods, such as carbohydrates, protein and fat, show lower intra-individual coefficients of variation than nutrients which are present in a few foods in large amounts, of which vitamins C and E as well as  $\beta$ -carotene are good examples. Our own results on specific nutrients are also in agreement with this.

If such recommendations as using 74 days of food records to achieve a 10% level of precision would tend to prove worthless on a practical ground, they notwithstanding indicate how cautious the interpretation of individual OTA intakes derived from a 7-day diary should be.

While the ratio  $S_w^2/S_b^2$  is fairly constant from one Box-Cox transformation to the other, the amount of within-person variance depends strongly on the scale chosen. Since the scales may be very different after applying different Box-Cox transformations, the variance components and their coefficient of variation may markedly differ too. We actually observe a 50% increase in  $CV_w$  between the one- and two-parameters transformations, which explains the discrepancies between numbers of days calculated from different sets of transformed data, as reported in table 4. Whatever the scale, the order of magnitude of number of days calculated suggests that the use of exposure modeling based on consumption and contamination data is not feasible in the case of OTA when the aim of the study is to estimate individual intakes, as in a cross-sectional study of exposure-effects association. Alternative options may be the use of biological markers of exposure where validation criteria are met (Schulte P.A. and Talaska G. 1995). In the case of OTA, though not thoroughly characterized, the amount of OTA in serum and urine could be considered as valuable surrogates of individual exposure levels (Palli et al. 1999; Gilbert et al. 2001; Pascale and Visconti 2001; Studer-Rohr et al. 2000; Zimmerli and Dick 1995).

## IV.3 Input data validity

### IV.3.1 Use of heterogeneous ('non-standardized') contamination data

Unlike for nutrients, no tables of food composition exist for chemicals such as additives, pesticides or contaminants. We thus gathered available data at the national level and assumed that the samples of foods analyzed for OTA were representative of the food groups to which they belong, that is sampling error is low, which we could not check in any way. The sampling step usually is the largest source of error along the test procedure steps, due to the

extreme mycotoxin distribution among kernels in the lot, as proved for aflatoxins in peanuts (Whitaker 2003). We made conservative assumptions related to the presence of OTA by using fixed average concentration levels in the deterministic model. Therefore, the outcome distribution shown in table 1 should only be considered to give an upper bound estimate of exposure, even when a variance reduction method relative to consumption variability is applied to data. This must be kept in mind when attempting to compare higher percentiles to TDI.

#### IV.3.2 Exclusion of low energy reporters from the study sample

Since it is undeniable that the problem of underreporting of energy can seriously bias any estimate that is based on self-reported intakes (Black and Cole 2001), we excluded 511 ‘under-reporters’ out of 1985 originally included participants, which corresponds to a 25.7% ‘exclusion rate’. Indeed, a quick view at the individual characteristics of this group showed a clear tendency among higher body mass index (BMI) groups to under-report total energy intakes (data not shown), as previously reported (Lichtman et al. 1992; Livingstone and Black 2003). As long as total exposure is ‘corrected’ for body weight on an individual basis, these individuals could potentially bias the estimates of exposure distribution in the direction of under-estimation (lower food intakes due to under-report divided by higher body weight). The relation between BMI and under-reporting has nevertheless recently been re-evaluated in the light of other factors such as dietary restraint and socio-economic status (Hill and Davies 2001; Lara et al. 2004), which was not tested here. The exclusion of those subjects from our study sample could certainly have introduced some level of bias in the sample composition, depending on the most under-reported foods and their implication as OTA vectors. Moreover, energy under-reporting did not influence estimate of food additive intakes at upper percentiles in a previous study (IEFS 2001), questioning the relevance of excluding energy under-reporters from exposure assessment studies on a systematic basis. Moreover, it is important to note that those individuals, though numerous enough, only represent ‘severe’ underreporting and that their exclusion does not allow in itself to correct for the widespread moderate underreporting phenomenon.

#### IV.3.3 Available number of days of food record

We assumed that the available number of days of food records (7) was representative of a longer period (several months), which would allow us to characterize within-individual variability of food intakes so that the between-individuals variability is not obscured. This is an important issue as short survey duration usually leads to an over-estimate of the prevalence of low and high intakes as well as a low precision in means estimates (Beaton et al. 1979). We thus considered that the average of 7 replicate measurements of an individual’s diet (7-day food record diary) was a good approximation of true usual dietary intakes. However, Heaney et al. (1990) showed across a 5-year study that less than 25% of the variance of nutrient intakes (Ca, P, protein and energy) could be accounted for by ‘current’ intake.

We also admitted that consecutive days measured on any individual were as variable as non-consecutive days, and we performed the variance components analysis based on 7 consecutive days of record. Yet, Tarasuk and Beaton (1992) evidenced that adjacent-day samples tend to underestimate true within-subject variation, which means that our estimate of within-person variance component could be lower than the ‘true’ day-to-day and seasonal variability encountered by an individual in the qualitative and quantitative composition of his/her diet. They also challenged the assumption that all respondents have equal within-person variance. Yet, the impact of these two hypotheses is likely to be small, particularly the latter, as the procedure used to select an optimal power transformation was designed by Hoffmann et al.

(2002) to stabilize within-person variance.

#### IV.3.4 Linking of food items (consumption) with food groups (contamination)

One of the main differences we noticed while trying to relate our results to previously published data on OTA exposure is that, even when raw consumption and contamination data sets are, if not the same, highly comparable, the distribution of exposures vary dramatically depending on the effort put into converting foods 'as consumed', for which individual information about quantities is recorded, into foods at the 'raw edible level', which usually corresponds to the level at which contamination data are available. Indeed, the chemical analyses have often been conducted for the purpose of assessing compliance with regulations, and therefore it is the raw products that are sampled. For many foods, the raw product does not correspond to the food 'as eaten', hence the need to develop databases that convert food as eaten back to raw agricultural commodities. In the case of OTA, the situations observed in published literature varied from the use of no recipes at all (Tressou et al. 2004) - which tends to over-estimate exposures -, to simple percentages of dry matter for cereal-based products (Verger et al. 1999) - which tends to under-estimate exposures -, and complex recipes - which tries to approach as accurately as possible the true composition of the diet (present results). The later effort inevitably encounters similar problems as those described for the development of food composition databases (Ireland et al. 2002; Greenfield & Southgate 1992). Systematic and random errors in food composition databases may bias (non-)nutrients intake estimation and make them incomparable at international level, altogether leading to wrong public health measurements and conclusions, as for the comparison of exposures to tolerable daily intakes (TDI) or the relation between diet and disease. Recipes and conversion factors development should thus be an important task in the effort to improve the assessment of exposures to food chemicals.

## V CONCLUSIONS

Our results about fitness-for-purpose of dietary survey duration showed that, as for nutrients, exposure assessment to food chemicals raises different methodological issues and options at the population and at the individual levels. While efficient variance reduction methods using as few as 3 non-consecutive days of food records may considerably lower measurement error in the estimated distribution of usual OTA intakes, it is not realistically feasible to get an acceptable level of precision in the assessment of individual OTA intakes through the combination of dietary survey and contamination data.

We thus recommend: (1) the implementation of variance reduction when the aim is to assess exposure at the population level; (2) considering alternative individual exposure measurement tools such as biomarkers provided validation criteria are on the track to be met.

# CONCLUSION:

## INDIVIDUS ET POPULATIONS

### I EXPOSITION DE LA POPULATION : LE MAILLON FORT

#### I.1 Le cas de l'OTA

##### I.1.1 Variabilité de la contamination

Nous avons montré, dans le cas de l'OTA, que la fenêtre temporelle utilisée pour tirer les valeurs de contamination dans le cadre de la modélisation probabiliste avait une influence considérable sur la variabilité et l'incertitude des paramètres estimés, dimension du modèle jamais prise en compte jusqu'ici. Même en présence de données désagrégées telles que disponibles dans la base INCA, les simulations ont jusqu'ici été réalisées sur les données agrégées au niveau de la semaine. Or une discussion des hypothèses relatives à l'occurrence de la contamination et aux comportements d'achat des consommateurs correspondant aux différentes fenêtres temporelles indique que c'est le tirage au niveau de l'« occasion » de consommation qui serait le plus pertinent dans le cadre de l'évaluation de l'exposition de la population française.

Le modèle probabiliste que nous proposons, alliant distributions non-paramétriques de contamination et tirages au niveau de la fenêtre « occasion », conduit à une probabilité très faible de dépassement de la DJT la plus « protectrice » (SCF 1998), largement inférieure à 1% (9‰). En admettant que ce modèle et les données « source » injectées reflètent la réalité de l'exposition à l'OTA dans la population adulte française, le risque associé à ce contaminant ne peut être considéré comme significatif. Les résultats récemment publiés à partir de l'étude de la diète totale française confirment cette évaluation en rapportant une proportion de dépassement de la DJT dans la population française de 0.9% (Leblanc J.-C. et al. 2005).

##### I.1.2 Variabilité des ingérés alimentaires

La question du nombre de jours d'enquête nécessaire à l'estimation de la distribution des expositions à l'OTA, en particulier les percentiles élevés, n'a encore jamais été abordée. Nous montrons que 3 jours non consécutifs combinés à une méthode simplifiée de réduction de la variance empruntée à l'épidémiologie nutritionnelle permettent d'augmenter considérablement la précision des estimations aux percentiles élevés dans le cadre d'une modélisation de type déterministe.

En cohérence avec les approches probabilistes discutées plus haut à propos de la contamination, la probabilité de dépasser la DJT du SCF est très faible dans la population française (8‰) sur la période considérée.

#### I.2 Un point de vue plus général

L'évaluation de l'exposition alimentaire à l'OTA et à d'autres toxiques, étape clé du processus d'évaluation du risque et de la surveillance sanitaire, fait l'objet de développements méthodologiques, en particulier statistiques, de plus en plus poussés, que ce soit dans la prise en compte des valeurs de contamination inférieures aux limites de détection (maximum de vraisemblance pour les distributions paramétriques et estimateur de Kaplan-Meier pour les distributions empiriques), l'ajustement des queues de distribution (théorie des valeurs extrêmes), la caractérisation de l'incertitude autour des estimations (construction d'intervalles de confiance par « bootstrap »), la réduction de la variance des ingérés (méthode de Nusser

simplifiée et ses coreligionnaires) et plus généralement la reconstruction de la variabilité des niveaux de contamination et des paniers de consommation (simulations de type Monte Carlo). Incontestablement, ces raffinements méthodologiques apportent précision et validité aux estimations de l'exposition dans les populations considérées, en particulier pour les forts percentiles susceptibles de dépasser les doses toxicologiques de références (DHTP pour l'OTA traduite par une DJT).

Pourtant, nos travaux illustrent l'importance de garder en mémoire les caractéristiques des phénomènes étudiés au moment du choix, de la spécification, et de la mise en œuvre du modèle. Modéliser une exposition par des méthodes sophistiquées sans prendre en compte les facteurs de « process », en particulier (cf. figure 1 de l'introduction), risque fort de conduire à des conclusions erronées.

Dans le cadre de la modélisation stochastique, le choix de la distribution paramétrique censée décrire l'occurrence de la contamination devrait idéalement rendre compte ou être compatible avec le processus de production-dégradation de la toxine considérée à l'origine de la variabilité réelle. En outre, le problème des queues de distributions paramétriques pourrait être abordé sous l'angle de la troncature à droite par le choix d'une valeur maximale de contamination sur la base d'une revue des données de contamination existantes et des conditions optimales de production de la toxine.

De même avec la modélisation déterministe, le choix du nombre de jours d'enquête devrait être discuté en fonction de l'importance relative des variances intra- et inter- individuelles, ce afin d'appréhender la possible surestimation des percentiles élevés d'exposition en cas de variabilité intra-individuelle forte des ingérés alimentaires. Bien entendu, le nombre de jours d'enquête calculé n'est valable que dans la mesure où l'effectif enquêté est suffisamment grand pour refléter la variabilité inter-individuelle des ingérés. Dans le cadre d'études de grande échelle, des considérations de coût peuvent intervenir dans le choix de la balance entre le nombre de sujets enquêtés et le nombre de jours d'enquête par sujet. Beaton et al. (1979) ont à ce titre proposé une formule pour déterminer le nombre de répétitions (k) présentant le meilleur rapport coût/efficacité :

$$k = R \sqrt{\frac{C_1}{C_2}}$$

Où R est le ratio de la variance intra- sur la variance inter-individuelle,  $C_1$  est le coût de recrutement d'un nouveau sujet dans l'étude, et  $C_2$  est le coût de réalisation d'une d'enquête auprès d'un individu de l'échantillon pendant une journée.

Enfin, bien que le terme d'exposition « usuelle » soit évoqué dans le cadre des estimations corrigées, la tendance « long-terme » mise en évidence dans la population d'étude correspond à des habitudes alimentaires somme toute ponctuelles, reflétant au mieux la période de vie que traverse chaque catégorie de personne enquêtée en fonction notamment de son âge, son sexe, sa situation matrimoniale et financière.

Tout comme dans le cas de la mise en regard des apports nutritionnels estimés avec les apports nutritionnels conseillés, la situation populationnelle n'est pas statique et nécessite d'être réévaluée régulièrement à partir de l'actualisation des tendances de consommation et de contamination (Volatier et al. 2002).

### I.3 Garder contact avec la réalité...

De nombreuses hypothèses relatives à la réalité « décrite » (« construite » ?) par le modèle sont donc posées implicitement, hypothèses qu'il est indispensable d'explicitier lors de l'interprétation des résultats. La variabilité des niveaux de contamination à laquelle un individu de la population est exposé en fonction du profil de société de consommation dans lequel il évolue peut notamment être prise en compte dans le modèle par le choix d'une fenêtre temporelle *ad hoc*. La variabilité court-terme des ingérés alimentaires se surimposant aux tendances sur le long-terme peut également être corrigée par des méthodes appropriées.

Dans tous les cas, les méthodes et outils les plus avancés ne peuvent remplacer la qualité des données « source » et une compréhension approfondie des phénomènes décrits, même à se placer dans une approche bayésienne qui devient courante en modélisation des expositions alimentaires de type microbiologique.

## II EXPOSITION INDIVIDUELLE : LE MAILLON FAIBLE

### II.1 Le cas de l'OTA

L'évaluation de l'exposition individuelle à l'OTA à partir de données de consommation et de contamination n'a jusqu'ici pas été abordée dans la littérature. Transposant les problématiques nutritionnelles à celles des contaminants alimentaires, nous discutons la relation existant entre variabilité intra-individuelle des ingérés, nombre de jours d'enquête, et précision de l'estimation de l'exposition. Nous concluons qu'une approche de type carnet alimentaire ou rappels de 24h ne semble pas réaliste et recommandons l'utilisation de marqueurs biologiques d'exposition à l'OTA. Le recueil concomitant d'informations alimentaires par le biais d'un questionnaire de fréquence alimentaire (QFA) semi-quantitatif peut avantageusement compléter la démarche en apportant des éléments d'identification des vecteurs de la toxine, mais aussi des habitudes d'approvisionnement et d'autoconsommation susceptibles d'expliquer la variabilité de l'imprégnation. Quoiqu'à un niveau populationnel, cette option « mixte » a d'ailleurs récemment été adoptée dans le cadre de l'évaluation de l'exposition aux dioxines des populations vivant à proximité des usines d'incinération des ordures ménagères (UIOM), exposition majoritairement d'origine alimentaire (consommation de produits locaux en particulier) très difficile à quantifier du fait de la rareté des données de contamination disponibles (AFSSA and InVS 2003).

Le problème, classique en épidémiologie, de l'antériorité de l'exposition par rapport à l'effet étudié est en outre ici particulièrement aigu, dans la mesure où non seulement les habitudes alimentaires sont susceptibles de changer au cours de la vie de la personne, mais aussi les niveaux de contamination des aliments constituant sa diète, ce manifestement bien au de-là des variations de composition nutritionnelle des aliments, sauf à considérer l'introduction récente des aliments fortifiés.

### II.2 Un point de vue plus général

On constate une faiblesse générale des outils de « mesure » des expositions alimentaires toxiques au niveau individuel. Les problèmes rencontrés en épidémiologie nutritionnelle sont doublés de difficultés inhérentes à l'évaluation des contaminations alimentaires, à leur variabilité géographique et temporelle pour ce qui est des produits bruts et finis, et à l'influence du stockage et des processus pour les produits transformés (potentielles différences entre marques notamment).

Dans l'étude des relations entre exposition alimentaire à l'acrylamide et risque de cancer dans la population suédoise, pour ne citer qu'un exemple, la construction d'un score individuel d'exposition à partir d'un questionnaire de fréquence semi-quantitatif et de rares analyses du contenu en acrylamide des aliments vecteurs identifiés dans la diète suédoise (1 à 21 échantillons analysés par groupe d'aliments) n'a pas permis de mettre en évidence une quelconque élévation du risque de cancer du rein et de vessie, et a même suggéré l'existence d'un effet protecteur vis à vis du risque de cancer du côlon-rectum (Mucci et al. 2003; Mucci et al. 2004). Dans quelle mesure cette absence d'association pourrait être liée à une erreur non-différentielle de classification dont on sait qu'elle tend à biaiser l'estimation du risque relatif (Rothman K.J. and Greenland S. 1998) ?

La question se pose également de manière récurrente en épidémiologie nutritionnelle, notamment dans le cadre de l'évaluation du rôle protecteur de la consommation de fruits et légumes vis-à-vis du risque de cancer (Schatzkin and Kipnis 2004), et de l'implication des lipides dans l'augmentation du risque de cancer du sein (Bingham et al. 2003; Prentice 2003).

### III L'APPORT DES MARQUEURS BIOLOGIQUES

Depuis une dizaine d'années, l'utilisation de marqueurs biologiques d'exposition, de susceptibilité et d'effets a rencontré un certain écho, en épidémiologie professionnelle, environnementale et nutritionnelle notamment.

Les biomarqueurs d'exposition qui nous intéressent ici sont généralement utilisés :

- Soit comme outils de mesure de l'exposition passée - dans le cas de toxiques s'accumulant dans l'organisme (demi-vie longue) – ou présente (demi-vie courte et mesure à un temps initial de suivi, lors de l'inclusion dans une étude de cohorte prospective par exemple, ou de la surveillance de l'imprégnation d'une population donnée au cours du temps) ; l'information quantitative qu'ils apportent peut être complétée par des informations qualitatives recueillies par voie de questionnaire portant sur les sources, les voies et les durées d'exposition notamment ;
- Soit comme « étalon-or » dans le cadre de la validation d'un autre outil de mesure de l'exposition. Cette approche a été développée dans le cadre des études d'exposition aussi bien populationnelles qu'individuelles.

L'étude de l'association entre risque de cancer primaire du foie et exposition alimentaire aux aflatoxines a longtemps été biaisée par l'absence d'outils fiables de mesure de l'exposition. La validation des adduits urinaires comme marqueurs d'exposition chronique à l'aflatoxine B1, la plus toxique des aflatoxines, a permis de caractériser le risque relatif de survenue de cancer entre groupes d'exposition extrêmes ainsi qu'un effet synergique avec le virus de l'hépatite B dans les populations où ce virus est endémique, en particulier certaines provinces de Chine et au Sénégal (Groopman et al. 1993; Wild et al. 1993). Plus récemment, l'utilisation des adduits de l'aflatoxine à l'albumine sérique a mis en évidence une association entre exposition aux aflatoxines et retards de croissance chez les enfants en Afrique subsaharienne (Gong et al. 2002).

L'utilisation du dosage du méthylmercure dans les cheveux et le sang du cordon ombilical a également permis d'étudier les effets neuro-développementaux des expositions *in utero* et infantiles liées à la consommation maternelle de poissons de mer (Davidson et al. 1998; Grandjean et al. 1997; Myers et al. 2003). Les biomarqueurs d'exposition au méthylmercure sont également utilisés dans le cadre de la validation des modèles prédictifs d'exposition basés sur des données alimentaires (Ponce et al. 1998).

L'épidémiologie « moléculaire » a également été utilisée pour les expositions au cadmium et

au plomb en contextes professionnel et environnemental pour la surveillance des imprégnations et leur mise en relation avec des effets toxiques rénaux plus ou moins précoces (Lauwerys et al. 1995).

Dans le cas des expositions nutritionnelles, les marqueurs biologiques sont de plus en plus utilisés dans des études de validation de questionnaires de fréquence alimentaire mis en œuvre dans des études grande échelle et multicentriques, car moins coûteux et plus facilement acceptables par les populations enquêtées. La méthode dite « des triades », qui tire partie de l'indépendance des erreurs aléatoires entre indicateurs alimentaires (questionnaires de fréquence alimentaire et rappels de 24h ou carnets) et indicateurs biologiques (biomarqueurs d'exposition) (Kaaks 1997), a été utilisée dans le cadre de la cohorte EPIC (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition) pour la validation des apports en protéines, vitamine C et bêta-carotènes estimés par QFA (Ocke and Kaaks 1997) ainsi qu'en populations française (Daures et al. 2000) et espagnole (Kabagambe et al. 2001).

L'utilisation dans le processus de l'évaluation du risque de marqueurs biologiques spécifiques de l'exposition à un agent chimique donné est prometteuse mais nécessite en premier lieu une certaine inter-disciplinarité (Groopman and Kensler 1999). L'approche moléculaire ne devrait de plus pas faire perdre de vue que l'étude d'un facteur de risqué isolé a peu de chance d'apporter des informations pertinentes en termes de prévention à l'échelle de populations dans lesquelles les maladies surviennent dans des contextes socio-environnementaux singuliers (McMichael 1999; Pearce 1996; Pearce 1999).

## CHAPITRE 3:

**O T A R I**  
C U L E N  
H N I I V  
R I M N E  
A S E S  
T I N T  
O E T I  
X A G  
I T A  
N I T  
E O I  
N O N



HAMLET - Voyez-vous ce nuage, là-bas, qui a presque la forme d'un chameau ?  
POLONIUS - Par la messe ! On dirait que c'est un chameau, vraiment.  
HAMLET - Je le prendrais pour une belette.  
POLONIUS - Oui, il est tourné comme une belette.  
HAMLET - Ou comme une otarie...  
POLONIUS - Tout à fait comme une otarie !

Anonym Dada  
Après *Hamlet*, Acte III, Scène II, William Shakespeare.

# PROTOCOLE PRINCIPAL

<b>I</b>	<b>INTRODUCTION ET OBJECTIFS</b>	<b>127</b>
<b>I.1</b>	<b>Position du problème</b>	<b>127</b>
<b>I.2</b>	<b>Motivations de la recherche</b>	<b>127</b>
<b>I.3</b>	<b>Objectifs de la recherche</b>	<b>129</b>
I.3.1	Objectifs principaux	129
I.3.2	Hypothèse(s) testée(s)	129
I.3.3	Critères de jugement principaux	129
I.3.4	Objectifs secondaires	129
	Caractérisation de l'exposition	129
	Exploration des atteintes rénales	129
<b>II</b>	<b>MATERIEL ET METHODES</b>	<b>130</b>
<b>II.1</b>	<b>Type d'étude et démarche globale</b>	<b>130</b>
<b>II.2</b>	<b>Définition des populations « cible » et « source »</b>	<b>130</b>
II.2.1	Ruralité de l'habitat	130
	Régimes alimentaires	130
	Approvisionnement et stockage	131
II.2.2	Écologie des milieux	132
II.2.3	Identification des zones d'étude	132
<b>II.3</b>	<b>Définition de l'échantillon d'étude</b>	<b>135</b>
II.3.1	Principe de constitution de l'échantillon d'étude	135
II.3.2	Principaux critères d'inclusion et de non inclusion	135
II.3.3	Calcul de la taille de l'échantillon d'étude	136
<b>II.4</b>	<b>Choix des indicateurs d'exposition et d'effets</b>	<b>138</b>
II.4.1	Indicateurs d'exposition	138
	Choix d'une approche	138
	Présentation des indicateurs d'exposition	140
	Prévalence et concentrations	140
	Validité épidémiologique	142
II.4.2	Indicateurs d'effets toxiques rénaux	147
	Sites d'action de l'OTA	147
	Choix des indicateurs de néphrotoxicité	148
	Valeurs 'normales' en population générale	150
	Validité épidémiologique	151
<b>II.5</b>	<b>Recueil des informations individuelles</b>	<b>152</b>
II.5.1	Questionnaires administrés par un enquêteur	152
	Type de questionnaires	152
	Contenu des questionnaires	153
	Élaboration du questionnaire de fréquence alimentaire	154
	Score d'exposition à l'OTA	155
II.5.2	Prélèvements alimentaires	155
	Identification de deux aliments-types par ménage	156
	Modalités des prélèvements	156
II.5.3	Prélèvements biologiques	156
	Nature des prélèvements	156
	Importance des étapes, du prélèvement au stockage des échantillons	157
	Réalisation pratique	158

<b>II.6</b>	<b>Analyses biologiques et toxicologiques .....</b>	<b>159</b>
II.6.1	Dosage de l'OTA dans le sérum, les urines et les aliments.....	159
II.6.2	Utilisation de bandelettes urinaires .....	160
Principe du dépistage par bandelettes réactives.....		160
Plages réactives .....		160
Validité .....		160
II.6.3	Dosage de la créatinine sérique et urinaire.....	160
II.6.4	Estimation du débit de filtration glomérulaire (DFG).....	161
II.6.5	Dosage des indicateurs de toxicité rénale .....	162
Dosage de la $\beta$ 2- microglobuline, la RBP et l'albumine urinaires.....		162
Dosage de la NAG urinaire .....		163
Ajustement des résultats sur la créatine urinaire .....		163
<b>II.7</b>	<b>Principes généraux de l'analyse statistique .....</b>	<b>163</b>
<b>III</b>	<b>REALISATION PRATIQUE DE L'ETUDE .....</b>	<b>163</b>
<b>III.1</b>	<b>Déroulement de l'étude.....</b>	<b>163</b>
III.1.1	Durée de l'enquête terrain .....	163
III.1.2	Formation des personnels.....	163
III.1.3	Non-répondants et refus de participation .....	163
<b>III.2</b>	<b>Prise en charge et retour d'information aux participants .....</b>	<b>164</b>
III.2.1	Information et consentement des personnes se prêtant à la recherche .....	164
III.2.2	Prise en charge des personnes se prêtant à la recherche.....	164
<b>III.3</b>	<b>Contrôle qualité.....</b>	<b>164</b>
<b>III.4</b>	<b>Communication et diffusion des résultats de l'étude .....</b>	<b>164</b>
<b>III.5</b>	<b>Liste des partenaires scientifiques, techniques et financiers .....</b>	<b>164</b>

## PILOTE

<b>I</b>	<b>INTRODUCTION ET OBJECTIFS .....</b>	<b>166</b>
<b>II</b>	<b>MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>167</b>
<b>II.1</b>	<b>Constitution de l'échantillon d'étude .....</b>	<b>167</b>
II.1.1	Choix de la zone d'étude.....	167
II.1.2	Principe de constitution et taille de l'échantillon .....	167
<b>II.2</b>	<b>Réalisation pratique de l'étude .....</b>	<b>168</b>
II.2.1	Description des locaux, personnels et équipements .....	168
Locaux .....		168
Personnels.....		168
Equipements .....		169
II.2.2	Formation des personnels et suivi du terrain.....	169
II.2.3	Modalités de recrutement des participants .....	169
II.2.4	Organisation des visites et gestion des échantillons.....	169

<b>II.3</b>	<b>Aspects analytiques</b> .....	<b>170</b>
II.3.1	Protéinurie et enzymurie .....	170
II.3.2	Dosage de l'OTA .....	170
	Essai inter-laboratoires .....	170
	Dosage de l'OTA dans les échantillons du pilote.....	171
<b>II.4</b>	<b>Analyse statistique</b> .....	<b>171</b>
II.4.1	Saisie et contrôle des données.....	171
II.4.2	Construction d'un score d'exposition .....	172
II.4.3	Courbes de calibration .....	173
II.4.4	Étude des associations entre paramètres individuels et biologiques .....	173
<b>III</b>	<b>RESULTATS ET DISCUSSION</b> .....	<b>174</b>
<b>III.1</b>	<b>Réalisation pratique du pilote</b> .....	<b>174</b>
III.1.1	Bilan de la phase de recrutement.....	174
III.1.2	Acceptabilité du recueil des informations et des échantillons.....	174
III.1.3	Prise en charge des personnes se prêtant à la recherche.....	175
<b>III.2</b>	<b>Caractéristiques générales et alimentaires</b> .....	<b>175</b>
III.2.1	Données anthropométriques, socio-culturelles, et habitudes de vie .....	175
III.2.2	Habitudes alimentaires .....	177
	Approvisionnement alimentaire et habitudes de stockage.....	177
	Fréquence de consommation des aliments vecteurs .....	178
	Ochratoxine A dans les aliments .....	179
III.2.3	Score alimentaire d'exposition à l'OTA.....	180
<b>III.3</b>	<b>Ochratoxine A dans le sérum et les urines</b> .....	<b>180</b>
III.3.1	Distribution des indicateurs d'exposition.....	180
	OTA sérique .....	181
	OTA urinaire .....	183
III.3.2	Facteurs de variation des indicateurs d'exposition.....	183
	Facteurs anthropométriques et habitudes de vie .....	183
	Facteurs alimentaires .....	184
<b>III.4</b>	<b>Marqueurs urinaires de toxicité rénale</b> .....	<b>185</b>
III.4.1	Distribution des indicateurs d'effets.....	185
	Débit de filtration glomérulaire (DFG) et protéinurie .....	185
	Albumine urinaire.....	186
	$\beta$ 2microglobuline urinaire .....	186
	RBP urinaire .....	188
	NAG urinaire .....	188
III.4.2	Facteurs de variation des indicateurs d'effets .....	189
<b>IV</b>	<b>CONCLUSIONS</b> .....	<b>190</b>

# OTARI : PROTOCOLE PRINCIPAL

## I INTRODUCTION ET OBJECTIFS

### I.1 Position du problème

Depuis une vingtaine d'années, des équipes de recherche tunisiennes et françaises se sont intéressées à l'implication possible d'une mycotoxine de l'alimentation, l'ochratoxine A (OTA), dans la survenue de pathologies rénales de type néphropathie interstitielle ou tubulo-interstitielle chronique (NIC) en population tunisienne (Abid 2003; Abid et al. 2003; Bacha et al. 1993; Eko-Ebongue et al. 1994; Grosso et al. 2003; Hadidane and al. 1985; Maaroufi et al. 1995a; Maaroufi et al. 1995b).

L'exposition humaine à l'OTA est ubiquitaire et essentiellement alimentaire. De nombreuses denrées se sont avérées contaminées à des niveaux détectables : céréales (l'OTA a été détectée dans tous les types de céréales testés : maïs, blé, sorgho, riz, seigle, orge et avoine), graines de soja, café vert (grain), haricots et légumineuses, fruits secs (raisins), vins, bières, cacao, épices et herbes, jus de fruits (jus de raisin), reins de porc et boudin noir (Pittet 2001). Les moisissures responsables de ces contaminations interviennent principalement au moment de la récolte et lors du stockage, les facteurs critiques étant la température et l'humidité relative des grains (Codex Alimentarius Commission 2000; Pitt 2002). Les principaux producteurs d'OTA isolés à partir de denrées naturellement contaminées appartiennent aux genres *Aspergillus* (notamment *A. ochraceus*, *A. carbonarius*, *A. niger*) et *Penicillium* (en particulier *P. verrucosum*), les espèces du genre *Aspergillus* se développant à température élevée (régions tropicales, sub-tropicales et méditerranéennes) tandis que celles du genre *Penicillium* sont associées à des températures et activités de l'eau modérées (régions tempérées) (Pitt 2002).

Initialement incriminée dans la survenue de néphropathies en élevage porcin (Krogh and al. 1973), cette mycotoxine présente des effets néphrotoxiques chez toutes les espèces mammifères testées expérimentalement (WHO 2002) et a été classée dans le groupe 2B du CIRC (IARC 1993) (cancérogène possible chez l'homme). Son implication étiologique dans la survenue d'une entité nosologique endémique dans les Balkans - la Néphropathie Endémique des Balkans (NEB), néphropathie tubulo-interstitielle chronique - a été évoquée dès 1976 (Krogh and Elling 1976) et étudiée par diverses équipes de recherche sans qu'aucune conclusion claire n'ait pue être tirée (Tatu and al. 1998). Cette affection semble être multi-factorielle (Toncheva and al. 1998), la nature (initiation et/ou progression) et l'importance du rôle de l'OTA restant incertains (Pfohl-Leszkowicz and al. 2002).

La réalité et l'importance des effets toxiques de l'exposition à l'OTA en terme de santé publique posent donc encore aujourd'hui largement question.

### I.2 Motivations de la recherche

La population tunisienne a une alimentation riche en produits à base de céréales, en légumes secs et en fruits secs (Institut National de la Statistique 1998). Ces aliments sont des vecteurs connus d'OTA (Pittet 2001), et les céréales contribuent à elles seules à hauteur de 44% à l'exposition de la population européenne (Miraglia and Brera 2002). De plus, les conditions climatiques lors du stockage (température et humidité) et les habitudes de préparation et conservation des aliments favoriseraient la contamination de ces denrées dans certaines régions de Tunisie (Achour and Bacha 2003; Bacha et al. 1988; Maaroufi et al. 1995a). Certains groupes de population présenteraient donc des niveaux élevés d'exposition à l'OTA

en Tunisie. Une variabilité géographique des niveaux sériques d'OTA a été démontrée par Maaroufi et al. (1995b) qui ont retrouvé des teneurs plus élevées sous climat humide et méditerranéen (gouvernorats de Monastir et Jendouba) qu'en bordure du désert (gouvernorat de Gafsa).

Par ailleurs, une pathologie rénale de type néphropathie interstitielle chronique (NIC), pour laquelle aucune cause n'a pu être identifiée, a été décrite sur le plan clinique dans la population tunisienne (Achour and al. 1993) et sévirait actuellement de manière endémique en Tunisie, voire dans la région sud-méditerranéenne dans son ensemble (Achour and Bacha 2003; Barsoum 2003; Filali A. and et al. 2002; Khalef et al. 1993b; Khalef et al. 1993a; Wafa 1998, chapitre 1 du présent manuscrit).

Il est à noter que, outre les problèmes généralement rencontrés lors de l'étude des causes des pathologies rénales chroniques (Perneger and al. 1995), les études étiologiques relatives aux NIC décrites en Tunisie sont compliquées par un diagnostic tardif et incertain. Ceci est à mettre en relation avec le caractère asymptomatique de leur évolution à bas bruit jusqu'à des stades très avancés se traduisant par une insuffisance rénale chronique (IRC). Le diagnostic est le plus souvent porté secondairement à la découverte d'une IRC et sa confirmation par biopsie rénale rarement réalisable (environ 5% des cas), ce qui explique probablement la forte proportion de NIC de cause indéterminée parmi les IRC de cause NIC (environ 25%) (Sabra 2001). Cette proportion a été estimée en 1998 pour les cas incidents d'IRC diagnostiqués dans la région du Centre (gouvernorats de Monastir, Sousse, Mahdia et Kairouan : 1.8 millions d'habitants), avec un taux d'incidence (TI) de l'IRC de 162.7pmh, un TI d'IRC de cause NIC de 40.7pmh ; et un TI d'IRC de cause NIC indéterminée de 12.2pmh. Il est donc actuellement difficile de décrire l'épidémiologie de cette NIC dans la population tunisienne et de juger de la réalité de son endémicité. De plus, environ 33% des cas incidents d'IRC étaient de cause indéterminée en 2001 (République Tunisienne 2001), ce qui pose problème en terme d'interprétation des données descriptives (forte incertitude sur l'estimation des TI spécifiques à chaque pathologie primaire).

Par ailleurs, les NIC étant encore très mal décrites dans la littérature néphrologique et épidémiologique, l'évaluation du caractère d'entité nosologique à part entière de cette affection - au même titre que la NEB a pu l'être et se voir attribuer un code dans la classification des maladies rénales établie par l'EDTA - est extrêmement difficile.

Sur les plans cliniques, biologiques et anatomo-pathologiques, cette affection présente des similitudes avec la NEB (Achour and al. 1993) dont nous avons vu que l'OTA est suspectée d'être un facteur d'initiation ou de progression. Or la toxine a été retrouvée en quantités significativement plus élevées dans le sérum de patients tunisiens diagnostiqués NIC de cause indéterminée que chez les groupes témoins (personnes en bonne santé et patients atteints d'autres affections rénales chroniques) (Abid et al. 2003). Ces arguments, conjugués aux hypothèses relatives à l'existence de groupes fortement exposés dans la population tunisienne, font de cette toxine le principal facteur de risque pressenti pour cette NIC et actuellement étudié.

Notre travail se situe dans le cadre de cette recherche sur l'existence d'un lien étiologique entre l'exposition à l'OTA et les néphropathies interstitielles chroniques de cause indéterminée dans la population tunisienne.

Les principaux résultats devraient permettre d'apporter de solides éléments de réponse sur la réalité de l'exposition et des effets chroniques de l'OTA dans la population enquêtée et de juger de la nécessité de pousser plus avant les investigations épidémiologiques y afférentes.

### I.3 Objectifs de la recherche

#### I.3.1 Objectifs principaux

La présente étude a pour objectifs :

- De quantifier les niveaux d'exposition individuelle à l'OTA de la population de trois régions tunisiennes dans des échantillons de taille suffisante pour mettre en évidence une certaine variabilité inter-individuelle et inter-régionale ;
- D'explorer l'existence d'une association entre le niveau d'exposition individuelle à l'OTA et la survenue d'effets toxiques rénaux à un stade infra-clinique, ce en tenant compte des éventuels facteurs de confusion.

#### I.3.2 Hypothèse(s) testée(s)

Les principales hypothèses qui seront testées dans cette étude sont que :

- Il existe des variations régionales d'exposition alimentaire de la population tunisienne à l'OTA en raison de variations des conditions climatiques, d'habitudes de préparation, stockage et consommation des aliments ;
- Il existe une corrélation entre le niveau d'exposition individuelle à l'OTA et la survenue de manifestations toxiques rénales à un stade infra-clinique dans la population tunisienne.

#### I.3.3 Critères de jugement principaux

- Analyse de variance (ANOVA) révélant une différence statistiquement significative du niveau d'exposition entre les trois régions d'étude ;
- Coefficient de corrélation statistiquement significatif révélant l'existence d'une association entre le niveau de toxicité rénale et le niveau d'exposition à l'OTA (après ajustement sur les éventuels facteurs de confusion).

#### I.3.4 Objectifs secondaires

##### Caractérisation de l'exposition

Les corollaires à l'objectif principal d'évaluation de l'exposition à l'OTA sont : De vérifier les hypothèses relatives aux vecteurs alimentaires d'OTA et aux facteurs de variation de la contamination (approvisionnement, préparation, stockage) ;

- D'évaluer la variabilité intra-individuelle (saisonnière) de l'exposition à l'OTA.

##### Exploration des atteintes rénales

En plus d'explorer la corrélation entre le niveau d'exposition à l'OTA et la survenue d'atteintes rénales, nous pourrons identifier les facteurs démographiques, sociaux et environnementaux de confusion et d'interaction dans l'association entre exposition à l'OTA et marqueurs de toxicité rénale.

## II MATERIEL ET METHODES

### II.1 Type d'étude et démarche globale

La méthodologie retenue est celle d'une étude transversale avec passation de questionnaires et prélèvements biologiques répétés à deux saisons différentes, une variation saisonnière de la séroprévalence et des niveaux moyens d'OTA sérique ayant précédemment été décrite, plus élevés en été qu'en hiver (Palli et al. 1999).

Nous souhaitons constituer un échantillon d'étude présentant une forte variabilité des niveaux d'exposition à l'OTA. Nous choisissons pour ce faire de constituer trois groupes de sujets à partir de l'identification *a priori* de trois régions d'étude contrastées au regard de l'exposition à l'OTA.

Les sujets inclus dans chaque groupe d'exposition *a priori* seront interrogés par un enquêteur (questionnaires socio-démographique, médical et sur les habitudes de vie, notamment alimentaires). Un prélèvement de sang total et le recueil d'un spot des secondes urines du matin seront effectués lors de chacune des deux campagnes d'enquête. Des analyses biochimiques et toxicologiques seront effectuées sur les échantillons de sérum (notamment OTA et créatinine) et d'urines (OTA, créatinine, marqueurs d'atteintes rénales précoces).

### II.2 Définition des populations « cible » et « source »

Nous souhaitons identifier *a priori* trois régions d'étude :

- une région « fortement exposée » : niveaux d'exposition « élevés » ;
- une région « moyennement exposée » : niveaux d'exposition « moyens » ;
- et une région « témoin » : niveaux d'exposition « faibles ». Il n'est en effet pas possible de définir *a priori* un groupe « non exposé », la prévalence de l'OTA dans les sérums tunisiens étant de 62 à 82% à LOD 1 ng/ml (Abid et al. 2003) à 100% à LOQ 0.1 ng/ml (Eko-Ebongue et al. 1994).

Pour ce faire, deux hypothèses peuvent être formulées quant aux déterminants de la variabilité régionale de la composition de la diète tunisienne et des niveaux de contamination par l'OTA des aliments de base et traditionnels.

#### II.2.1 Ruralité de l'habitat

Plusieurs études ont relevé une plus forte imprégnation (OTA sérique) dans des populations vivant en zone rurale en France (Creppy et al. 1993) et en Suède (Breitholtz et al. 1991) que chez les citadins, tendance interprétée comme reflétant une plus forte dépendance vis-à-vis (ou consommation) de produits locaux identifiés comme vecteurs d'OTA (céréales, vin, bière, viande de porc et « cochonnailles » ou volailles et leurs dérivés). Nous discutons ici l'influence que pourrait avoir la ruralité de l'habitat sur l'exposition à l'OTA en Tunisie, sans évoquer la voie alternative d'exposition par inhalation que certaines catégories d'ouvriers agricoles sont susceptibles de rencontrer au cours de leur activité professionnelle (Halstensen et al. 2004; Iavicoli et al. 2002).

#### Régimes alimentaires

L'alimentation tunisienne traditionnelle est encore aujourd'hui typique des populations du bassin sud de la Méditerranée, à ceci près qu'une certaine uniformité liée à la disponibilité croissante des produits sur les marchés remplace la diversité saisonnière qui prévalait

jusqu'aux dernières décennies. L'alimentation tunisienne traditionnelle repose sur le blé dur transformé de manière artisanale ou semi-artisanale, l'huile d'olive, la viande de mouton et divers fruits et légumes. Toutefois, la spécificité des microclimats tunisiens a engendré de nombreuses variantes autour de ce régime moyen : la prédominance de l'autoconsommation et la faiblesse des échanges entre les différentes régions du pays a ainsi introduit des différences parfois assez marquées (Jaouadi 2000). Par ailleurs, la tendance générale actuelle, plus marquée toutefois en milieu urbain que rural, est à la diversification du régime alimentaire dans lequel se juxtaposent désormais produits alimentaires modernes et traditionnels (Beltaifa et al. 2002).

Il demeure que les habitudes alimentaires locales sont liées à la ruralité de l'habitat (Jaouadi 2000) : importance des céréales dans l'apport énergétique total, en particulier le blé dur, et consommation d'aliments traditionnels spécifiques (tels que *bsissa* : flan à base de farines de différentes céréales, de pelures d'oranges séchées, de dates et d'huile d'olive et *tchiche* : préparation de granules d'avoine consommés sous forme de nouilles). Ainsi, les céréales apportent près de 60% des calories de la ration en milieu non communal contre 50% environ en milieu communal (Institut National de la Statistique 2000c). De plus, les quantités de blé dur et de blé tendre consommées par personne et par an sont estimées à respectivement 55 et 89 kg en milieu communal contre 154 et 45 kg en milieu non communal (Institut National de la Statistique 2000c).

La prédominance du blé dur est un autre élément de suspicion de contamination dans la mesure où les variétés de blé dur couramment cultivées semblent plus susceptibles à l'OTA que pour le blé tendre (Mills 1990; Pfohl-Leszkowicz and Molinié 2004).

#### Approvisionnement et stockage

L'OTA est essentiellement une toxine de stockage. Les importations et productions locales de céréales sont en principe centralisées par l'Office des Céréales. Les niveaux de contamination des matières premières et des produits industriels transformés à base de céréales devraient donc être relativement homogènes par effet de mélange et dilution au cours du stockage.

En revanche, une certaine variabilité des niveaux de contamination des produits autoconsommés provenant d'un stockage au niveau du ménage d'une partie de la production locale ne peut être exclue. En effet, en zone de production agricole (céréales, légumineuses, vin), et plus largement en zone rurale, des phénomènes tels que l'autoconsommation, l'existence d'un marché parallèle et le stockage domestique annuel ou biennuel des matières premières peuvent conduire à des conditions favorables à la contamination des produits de base par l'OTA.

La centralisation de la totalité des céréales brutes par l'Office des Céréales implique en théorie qu'autoconsommation et recours au marché parallèle sont « interdits » et officiellement rares : autoconsommation moyenne estimée à 0.7% en milieu communal et 4.9% en milieu non communal (Institut National de la Statistique 2000c) et en diminution constante d'après les enquêtes Budget-Consommation et de Niveau de Vie des Ménages réalisées entre 1975 et 2000, facteur auquel l'urbanisation rapide de la population concourt probablement. Toutefois de telles pratiques sont susceptibles de persister dans certaines zones rurales, comme en témoignent les statistiques du Ministère de l'Agriculture Tunisien : seulement 52% de la production de blé dur (qui couvre au total entre 30 et 70% des besoins du marché intérieur en fonction des campagnes céréalières) ont été collectés par l'Office des Céréales et les Coopératives agréées en 2000 (République Tunisienne 2001). Ce phénomène d'autoconsommation et d'approvisionnement local est susceptible de varier largement en fonction de l'importance des récoltes qui demeurent encore largement tributaires des conditions climatiques.

Enfin, le stockage domestique, probablement encore largement pratiqué en zone rurale, pourrait concourir au développement des moisissures productrices d'OTA en rapport à l'humidité, la température, et la présence de ravageurs susceptibles d'endommager les grains, fournissant ainsi une porte d'entrée et des conditions favorables à la colonisation mycélienne. Ainsi, selon l'hypothèse développée ici, les populations rurales tunisiennes allient forte probabilité de contamination et consommation fréquente des produits potentiellement vecteurs d'OTA.

### II.2.2 Écologie des milieux

Les conditions écologiques lors de la récolte et du stockage, et en particulier la température et l'humidité des grains, jouent un rôle primordial dans la probabilité et l'importance de la contamination des céréales, et en particulier du blé, par l'OTA (Codex Alimentarius Commission 2000; Pitt 2002). Ainsi pouvons-nous nous attendre à ce que les conditions climatiques influent la contamination des céréales stockées dans la région même d'habitation, et *a fortiori* stockées par l'habitant lui-même.

La Tunisie est un pays de climat semi-aride, caractérisé par la rareté des ressources en eau et par une forte variabilité du climat dans l'espace et dans le temps. Le pays est divisé en 3 régions distinctes : le nord, le centre et le sud.

Au nord, les montagnes de l'Atlas protègent les vallées fertiles de la Medjerda où on cultive en majorité des céréales, en particulier le blé dur. On trouve sur les sommets de grandes forêts de pins, notamment à l'ouest. Le climat est de type méditerranéen, caractérisé par les sécheresses de l'été, mais les pluies sont suffisamment abondantes la plupart des années (entre 400 et 1000 mm par an) pour permettre les cultures non irriguées.

Le centre est formé d'un plateau semi-aride qui s'étend jusqu'à la Libye. On y trouve de nombreux lacs salés et des plantations d'oliviers en abondance. Le niveau des pluies est de 200 à 400 mm, ce qui est insuffisant pour les cultures non irriguées ; la région ne compte ainsi que 15 % environ des terres cultivées, comprenant blé dur et orge.

Le sud, formé par le Grand Erg Oriental qui prend naissance en Algérie et se meurt en Libye, couvre 60 % de la superficie du pays et présente un climat saharien. Les précipitations n'atteignent pas 200 mm par an, le régime des pluies étant caractérisé par une grande variabilité, avec de rares mais violents orages. Les palmeraies produisent les dattes. L'orge est aliment de base courant.

Enfin, des inondations, parfois de grande ampleur, sont signalées à intervalle régulier dans le nord et le centre du pays (IFRCRCS 2003), ce qui est susceptible d'altérer les conditions locales de stockage des céréales et de provoquer des variations temporelles d'exposition.

Ainsi, les conditions de température et d'hygrométrie favorables à l'OTA suivraient en Tunisie un gradient décroissant orienté Nord-Sud variable d'une année à l'autre en fonction des précipitations. En outre, la production de blé dur majoritaire au Nord du pays fait que cette région allie probablement, au moins occasionnellement, autoconsommation et toxico-génèse lors du stockage des céréales.

### II.2.3 Identification des zones d'étude

Afin d'augmenter les chances de pouvoir constituer un groupe « fortement exposé » tout en garantissant une certaine comparabilité des trois régions d'étude, nous choisissons de restreindre notre champ d'investigation au milieu rural dont les populations, d'après notre première hypothèse, sont susceptibles de présenter des niveaux d'expositions plus élevés et variables qu'en milieu urbain.

Schématiquement, nous considérons que les régions situées à l'Ouest du pays sont rurales, par opposition à l'Est, constitué par la côte méditerranéenne touristique et urbanisée.

Afin d'obtenir des niveaux d'exposition contrastés, nous recherchons alors, selon notre seconde hypothèse, une variabilité des conditions climatiques et identifions pour ce faire trois gouvernorats représentatifs de chacune des trois grandes régions : Jendouba (N-O), Sidi-Bouzyd (C-O) et Tozeur (S-O) (Tableau 1a et Figure 1).

Dans chacun de ces trois gouvernorats, nous identifions alors de manière raisonnée une commune rurale. Les villages, outre leur caractère « rural » (petite commune et habitat dispersé), doivent présenter une certaine comparabilité socio-économique et environnementale (notamment : taux de pauvreté, sources environnementales de contamination aux métaux lourds). La présence d'un centre de santé de base (CSB), d'un hôpital de circonscription ou d'un hôpital régional dans un périmètre proche ainsi que la qualité des relations entre la population et cette infrastructure sanitaire sont des critères de choix importants dans la mesure où nous sollicitons un soutien logistique et l'assistance du personnel (para)médical pour l'information et l'enquête des ménages. Trois communes rurales sont ainsi pressenties pour l'étude : Bou Salem (N-O), Jelma (C-O) et Nefta (S-O) (Tableau 1b).

Par suite, la **population cible** est la population des trois communes identifiées. La **population source**, de nature administrative, est la liste des ménages (unité de base) recensés dans chacune des trois communes lors du dernier recensement de la population en 1994 (base de sondage de l'Institut National de la Statistique INS qui doit être mis à jour prochainement sur le recensement de 2004).

	Jendouba (Nord)	Sidi Bouzid (Centre)	Tozeur (Sud)	Référence
Précipitations totales <sup>a</sup> (mm/an)	481±139	239±81	86±18	(Institut National de la Statistique 2000a)
Nombre de jours de pluie par an <sup>a</sup>	104±18	61±14	31±11	
Température <sup>b</sup> (°C)	21.4±6.9	20.2±6.7	25.0±8.1	(Institut National de la Statistique 2003)
Population <sup>c</sup>	430 100	404 100	98 500	
Population non communale	75.4%	78.5%	28.9%	(Institut National de la Statistique 1994)
Production de céréales	Blé	Blé et orge	Orge	(Ben Salem et al. 1994)
Autoconsommation de céréales	1.2% (N-O)	6.5% (C-O)	1.5% (S-O)	(Institut National de la Statistique 2000c)
Part des céréales dans l'apport calorique	57.2% (N-O)	61.5% (C-O)	58.3% (S-O)	
Taux de pauvreté <sup>d</sup>	1.5%	4.7%	5.1%	(Institut National de la Statistique 2000b)

a : moyenne±ET années 1994-2000 ; b : moyenne±ET année 2002 ; c : année 2002 ; d : en milieu non communal (moyenne nationale : 2.9%).

**Tableau 1a** : Caractéristiques des gouvernorats d'étude.

Délégation	Gouvernorat	Population communale	Population non communale	Population totale	Référence
Bou Salem	Jendouba (N)	17 748	61 243	78 991	
Jelma	Sidi Bouzid (C)	5 036	30 356	35 419	(Institut National de la Statistique 1995)
Nefta	Tozeur (S)	18 993	213 <sup>a</sup>	19 206	

a : en zone aride, l'habitat rural isolé est marginal et la majorité des ménages se regroupe autour de l'« agglomération ».

**Tableau 1b** : Population des communes d'étude (1994).



**Figure 1**: Carte administrative de la Tunisie figurant les trois gouvernorats d'étude.

## II.3 Définition de l'échantillon d'étude

### II.3.1 Principe de constitution de l'échantillon d'étude

Deux unités statistiques nous intéressent : la famille d'une part (ou plus exactement le ménage, unité de base du tirage dans la base de sondage des trois communes rurales choisies) et l'individu d'autre part.

En effet, nous souhaitons pouvoir étudier les variations d'exposition à l'OTA et des marqueurs de toxicité rénale à trois niveaux :

- Inter-individuel ;
- Intra-individuel (variations saisonnières) ;
- Intra-ménage.

Parmi les ménages tirés au sort, tous les individus éligibles pour l'inclusion se verront proposer de participer à l'étude. Les trois groupes seront stratifiés sur l'âge (par tranches de 20 ans : 20-39 ans, 40-59 ans et 60-79 ans) et le genre. L'inclusion se fera jusqu'à ce que le nombre requis de sujets soit atteint dans chaque groupe « commune-genre-âge ».

Le fait de choisir le ménage comme unité de base du tirage et de recruter toutes les personnes éligibles au sein d'un même ménage se justifie doublement, d'une part par un partage supposé des habitudes alimentaires au sein de la famille permettant de caractériser les aliments vecteurs d'exposition à l'OTA, d'autre part par le phénomène d'agrégation familiale observé dans différentes populations vis-à-vis des maladies rénales en général et de la néphropathie interstitielle chronique caryomégalique (NIK) décrite au chapitre 1 en particulier, ce à quoi des conditions « environnementales » (notamment l'alimentation partagée dans notre cas) et une composante génétique sont susceptibles de contribuer en proportions variables (Hoy 2000; Satko and Freedman 2005a; Satko et al. 2005b; Schelling et al. 1999). Certes le recrutement de plusieurs personnes au sein du même ménage aura tendance à diminuer la variabilité inter-individuelle des expositions, mais elle nous permettra d'appréhender les composantes « environnementales » et génétiques d'éventuels effets rénaux.

### II.3.2 Principaux critères d'inclusion et de non inclusion

Les critères d'inclusion et de non inclusion retenus sont (tableau 2) :

Inclusion	Non inclusion
Age : 20-79 ans	Diabète
Résidence ≥ 5 ans dans la zone d'étude	Infection urinaire
	Maladie uro-néphrologique sauf néphrite interstitielle et insuffisance rénale chronique de cause indéterminée

**Tableau 2** : Critères d'inclusion et de non inclusion.

Le diabète est un facteur de non inclusion courant (facteur de risque connu de « néphropathie diabétique ») car la fonction tubulaire, notamment le bilan entre excrétion et réabsorption, peut en être affectée (Dubrey and al. 1997; Watts et al. 1989; Watts et al. 1988; Whiting et al. 1979; Whiting et al. 1983). Sa prévalence est estimée à 6% en moyenne dans la population tunisienne, avec de fortes disparités régionales (Ben Romdhane 2001). La présence d'une infection urinaire perturbe par ailleurs l'interprétation de l'analyse des protéines urinaires

(Mengoli et al. 1982; Schardijn et al. 1979). À ces critères généraux s'ajoutent deux facteurs de non inclusion concernant les femmes : la menstruation au moment de la réalisation du prélèvement urinaire et une grossesse en cours (Cheung et al. 1989; Hultberg et al. 1989; Skrha et al. 1989). Nous choisissons de ne pas exclure les cas d'hypertension artérielle (HTA), dont la prévalence très élevée est estimée entre 13 et 37% dans la population tunisienne (Ben Romdhane 2001). Toutefois, la pression artérielle sera mesurée, des informations relatives à l'HTA connue et traitée recueillies et un ajustement statistique effectué si nécessaire. En effet, bien que l'hypertension artérielle soit corrélée positivement à une élévation de certaines protéines et enzymes urinaires, notamment la NAG (Mansell et al. 1978), la prise de médicaments anti-hypertenseurs peut avoir un effet compensatoire (Simon and Altman 1982).

### II.3.3 Calcul de la taille de l'échantillon d'étude

Le calcul de taille d'échantillon que nous faisons *a priori* concerne la variabilité des marqueurs d'effet attendue dans la population d'étude. Nous nous situons dans le cas simple d'un test de comparaison de deux moyennes. À partir d'une analyse de la littérature donnant des estimations de la moyenne et de l'écart-type de la distribution des paramètres urinaires qui seront dosés (voir II.4.2), en particulier la RBP (Retinol Binding Protein) et la NAG (N-acétyl-β-D-glucosaminidase), nous pouvons calculer la taille de l'échantillon nécessaire à la mise en évidence d'une augmentation  $\Delta$  de la moyenne de la distribution observée entre deux groupes d'exposition.

Ne connaissant pas l'amplitude de la variation réelle des paramètres rénaux entre les groupes d'exposition que nous allons constituer, nous calculons la taille de l'échantillon nécessaire à la mise en évidence d'une différence modérée, de l'ordre de 10%, entre la moyenne du groupe faiblement exposé ( $\mu_1$ ) et celle du groupe d'exposition intermédiaire ( $\mu_2$ ). Le même raisonnement s'applique pour la comparaison des groupes moyennement et fortement exposés.

En posant pour hypothèses *a priori* que :

- La distribution du paramètre étudié est normale ou l'effectif est supérieur ou égal à 30 dans les deux groupes ;
- la variance inter-individuelle  $\sigma^2$  est la même dans les deux groupes ;
- les effectifs des deux groupes sont égaux ;

La formule reliant la taille de l'échantillon dans chaque groupe et la puissance du test de comparaison de moyennes effectué s'écrit (Bouyer 1996) :

$$n = 2\phi^2 \frac{\sigma^2}{\Delta^2} \quad (1)$$

où  $\phi = Z_{\alpha/2} - Z_{1-\beta}$  test bilatéral ( $\mu_1 \neq \mu_2$ ) et  $\phi = Z_{\alpha} - Z_{1-\beta}$  test unilatéral ( $\mu_1 < \mu_2$ )  
 $\alpha$  est le risque de première espèce (degré de significativité du test, ici  $\alpha=5\%$ )  
 $(1 - \beta)$  est la puissance du test (fixée ici à 80%)  
 $\Delta = |\mu_1 - \mu_2|$

Selon l'hypothèse d'une augmentation de 10% de la moyenne des protéines urinaires entre les groupes d'exposition « faible » et « moyenne » ou « moyenne » et « forte »,  $\Delta=0.1\mu_1$  et la formule (1) devient :

$$n = 2\phi^2 \frac{\sigma^2}{|0.1\mu_1|^2} \quad (2)$$

Ne connaissant pas les valeurs réelles de la moyenne  $\mu_1$  et de la variance  $\sigma^2$  dans la population tunisienne, nous utilisons des estimations  $m_1$  et  $s^2$  calculées à partir d'études antérieures portant sur une population masculine d'origine belge (Taylor and al. 1997) (tableau 3).

Analyte urinaire	n	$m_1$	s
RBP ( $\mu\text{g/g cr}$ )	256	62.8	29.9
NAG (U/g cr)	255	1.38	0.73

**Tableau 3** : Effectif (n), moyenne géométrique ( $m_1$ ) et écart-type géométrique (s) de la RBP et de la NAG urinaires estimés dans un groupe témoin.

Par suite, les effectifs par groupe calculés *a priori* (formule (2)), sont (tableau 4a) :

Analyte urinaire	Test bilatéral	Test unilatéral
RBP	356	280
NAG	440	346

**Tableau 4a** : Effectifs calculés par groupe d'exposition.  $\Delta=0.1m_1$ ,  $\alpha=5\%$ ,  $(1-\beta)=80\%$ .

Notre étude portant sur trois groupes d'exposition, la taille totale de l'échantillon devrait être de 840 à 1320, donc avoisiner ou dépasser le millier pour satisfaire aux critères souhaités ( $\alpha$  et  $\beta$ ) selon les hypothèses spécifiées (analyte urinaire, test uni- ou bilatéral). Toutefois, deux mesures d'exposition et d'effet étant prévues par sujet (deux vagues de prélèvements biologiques à deux saisons différentes), nous devrions, d'après des études antérieures sur la variabilité intra-individuelle des marqueurs précoces de néphrotoxicité (Stengel et al. 1999), pouvoir diminuer la taille de l'échantillon de 20% tout en conservant la même puissance.

A titre indicatif et afin de montrer l'influence des hypothèses relatives à l'ampleur de la variabilité attendue ( $\Delta$ ) sur l'effectif calculé ( $n$ ), nous donnons également les résultats obtenus en supposant une augmentation de la moyenne entre les deux groupes d'exposition égale au quart et à la moitié de l'écart-type ( $\Delta=0.25s$  et  $\Delta'=0.50s$ ). Dans ce cas, la taille de l'échantillon ne dépend plus de  $\mu_1$  ni de  $\sigma^2$ , donc ne dépend plus de l'analyte considéré, et l'équation (1) s'écrit :

$$n = \frac{2\phi^2}{d^2} \quad (3)$$

où  $d$  est égal à 0.25 ( $\Delta=0.25s$ ) ou 0.50 ( $\Delta'=0.50s$ ).

On constate (tableau 4b) une réduction considérable de l'effectif nécessaire (de l'ordre de 30% pour  $\Delta=0.25s$ ), l'effet à mettre en évidence étant plus important ( $\Delta=0.1m_1$  correspond à  $\Delta=0.21s$  pour la RBP et  $\Delta=0.19s$  pour la NAG).

$\Delta$	Test bilatéral	Test unilatéral
0.25s	251	198
0.50s	63	50

**Tableau 4b** : Effectif calculé par groupe d'exposition.  $\Delta=0.25s$  et  $\Delta'=0.50s$ ,  $\alpha=5\%$ ,  $(1-\beta)=80\%$ .

Enfin, à l'aide du logiciel G-Power (Faul and Erdfelder 1992), nous avons procédé à une analyse de puissance à partir des estimations du tableau 3 concernant la RBP et la NAG afin d'alimenter la discussion de l'équilibre à trouver entre contraintes matérielles de réalisation et exigences de validité des résultats et pourront alimenter l'interprétation et la discussion des résultats de l'étude.

En conclusion, nous appuyant sur les hypothèses et calculs explicités ci-dessus, nous prévoyons d'inclure un total de **900 sujets** pour la première vague d'enquête, soit un effectif de 300 sujets par régions d'étude. Chaque groupe régional de 300 personnes sera stratifié sur l'âge (trois catégories) et le genre (deux catégories), de sorte que chaque sous-groupe régional d'âge-genre devrait être constitué d'environ 50 personnes. La seconde vague d'enquête pourra être allégée en fonction des résultats intermédiaires de la première. En particulier, en cas de variabilité inter-individuelle des paramètres d'exposition et d'effets supérieure à nos hypothèses *a priori*, nous pourrions envisager de ne reconduire l'étude que pour un sous-échantillon de sujets, avec pour objectif principal d'évaluer la variabilité intra-individuelle des marqueurs étudiés.

## II.4 Choix des indicateurs d'exposition et d'effets

### II.4.1 Indicateurs d'exposition

#### Choix d'une approche

Deux approches sont envisageables dans l'estimation de l'exposition individuelle à l'OTA (Armstrong et al. 1992) : (1) une approche de « modélisation statistique » courante en épidémiologie nutritionnelle (Willett 1998) qui utilise d'une part des données individuelles de consommation recueillies par le biais d'un questionnaire alimentaire, et d'autre part des données de contamination des denrées consommées par la population d'étude ; (2) une approche de caractérisation biologique d'une substance, d'une structure ou d'un processus témoignant directement de ou étant corrélé à l'exposition considérée : le dosage de biomarqueurs empruntant aux méthodes de l'épidémiologie moléculaire (Schulte and Perera 1993).

La faisabilité de l'évaluation de l'exposition individuelle usuelle à l'OTA par le biais d'une enquête alimentaire (1) repose sur la disponibilité des données sources et sur le choix d'un modèle statistique permettant de les combiner. Modéliser l'exposition individuelle à l'OTA nécessite :

- d'estimer les consommations alimentaires usuelles des individus de la manière la moins biaisée (problèmes liés à l'incertitude, aux erreurs de mesures) et la plus précise possible (problèmes liés aux fluctuations d'échantillonnage au sens de « variabilité intra-individuelle » des ingérés) (Kroes and al. 2002; Willet 1998). La réalisation d'enquêtes alimentaires quantitatives est lourde et comporte de nombreux biais, notamment de mémoire, compliqués ici par un travail transculturel (ethnocentrisme des enquêteurs, niveau d'instruction peu élevé des enquêtés) (Cassidy 1994) ;
- d'estimer les niveaux de contamination des denrées alimentaires telles que consommées en tenant compte des problèmes d'échantillonnage (variabilité des niveaux de contamination dans un même lot, entre différents lots, en fonction des saisons) (Kroes and al. 2002; Whitaker 2003) et de la validité des méthodes analytiques (Brera and Miraglia 1996; Gilbert and Anklam 2002) ;

Dans le contexte d'étude qui est le nôtre, il n'est pas envisageable d'effectuer une enquête alimentaire quantitative satisfaisante sur le plan méthodologique, alliant carnet alimentaire ou rappels de 24h non consécutifs et plan d'échantillonnage alimentaire *ad hoc*. En effet, nous avons montré à partir d'un travail méthodologique sur des données françaises, que le nombre de jours d'enquête nécessaires à l'estimation de l'exposition individuelle à l'OTA avec une précision de 10% avoisinait les 70 (Council et al. 2005b), ce qui est infaisable en pratique (cf. chapitre 2, partie 2). À noter toutefois : du fait des habitudes alimentaires généralement moins diversifiées dans la population rurale tunisienne que dans la population générale française, on peut s'attendre à une moindre variabilité intra-individuelle des ingérés et donc au fait que le nombre de 70 jours soit surestimé. Plus importante encore est l'hypothèse formulée plus haut (II.2) selon laquelle le principal facteur de variation géographique de l'exposition à l'OTA attendue dans la population tunisienne est la variabilité des niveaux de contamination des denrées alimentaires. Or les données de contamination actuellement disponibles en Tunisie sont peu nombreuses et ne sont représentatives ni de la situation nationale, ni des variations régionales.

Aussi avons-nous choisi d'évaluer l'exposition individuelle à l'aide d'indicateurs biologiques simples (2), facilement utilisables dans le cadre d'une enquête épidémiologique de terrain : l'OTA sérique et l'OTA urinaire. Leur limitation majeure est que l'on ne connaît pas avec certitude la fenêtre temporelle d'exposition à laquelle ils se rapportent (quelques mois pour l'OTA sérique, probablement plus court terme pour l'OTA urinaire), ni l'importance de la variabilité intra-individuelle par rapport à la variabilité inter-individuelle dans notre population d'étude. Afin d'appréhender cette variance intra-individuelle, il est prévu d'effectuer deux prélèvements sur chaque sujet à deux saisons différentes (automne et printemps). Cela ne nous donnera pas d'indication sur la variabilité à très court terme du biomarqueur (nycthémère, variations journalières) mais permettra d'appréhender un éventuel « effet saison ». En raison de ces incertitudes, la terminologie d' « indicateur d'exposition » est par la suite préférée à celle de « bio-marqueur » ou « marqueur biologique d'exposition ».

## Présentation des indicateurs d'exposition

*L'OTA sérique* a jusqu'ici été l'indicateur utilisé quasi-systématiquement comme mesure biologique de l'exposition à l'OTA chez l'homme, probablement pour des raisons « historiques » : disponibilité d'une méthode analytique (Frohlich et al. 1988; Zimmerli and Dick 1995), début de caractérisation, quoique toute relative, de ses propriétés toxicocinétiques (Stander and al. 2001; Studer-Rohr et al. 2000), et par suite, par souci de comparabilité des nouveaux résultats à ceux précédemment publiés.

*L'OTA urinaire*, quoique moins étudiée, moins utilisée et moins abondante que dans le sang (problème des limites de détection et de quantification), présente un double avantage : les urines sont une matrice moins invasive à prélever, donc assurant en principe une bonne participation (acceptabilité) ; la seule étude de validation par repas dupliqués a mis en évidence une meilleure corrélation entre OTA alimentaire et OTA urinaire qu'avec l'OTA plasmatique (Gilbert et al. 2001).

C'est pourquoi le principal indicateur d'exposition que nous utiliserons dans nos analyses sera l'OTA urinaire. Toutefois, afin de pouvoir comparer nos résultats à ceux précédemment publiés, l'OTA plasmatique sera également mesurée. Les aspects abordés dans les paragraphes suivants sont relatifs à la validité « épidémiologique » des indicateurs et se réfèrent à la littérature relative à l'utilisation de marqueurs biologiques en épidémiologie.

## Prévalence et concentrations

Les tableaux 5a et 5b présentent quelques résultats quantitatifs obtenus dans différentes populations au cours des 15 dernières années pour le dosage de l'OTA dans des échantillons d'urines de 24h et de plasma ou de sérum.

Pays	N	LOD	>LOD/LOQ	Min-Max	$\mu \pm ET$	Référence
Grande-Bretagne	50	0.010	93%	0.007-0.058	<b>0.021</b> $\pm$ 0.003	(Gilbert et al. 2001; MAFF 1999)
Bulgarie	31	0.005	13%	0.017-0.041	-	(Castegnaro et al. 1991)
Bulgarie	16	4 (LOQ)	98%	0.010-1.910	0.132 $\pm$ 0.219	(Petkova-Bocharova et al. 2003)
Italie	38	0.005	58%	0.012-0.046	-	(Pascale and Visconti 2001)
Hongrie	88	0.005	61%	0.006-0.065	0.013	(Fazekas et al. 2005)

**Tableau 5a** : Niveaux d'OTA urinaire (ng/ml) dans quelques populations.

Pays	N	LOD	>LOD	min-max	$\mu \pm ET$	Habitat	Facteurs de variation	Interprétation	Référence
Algérie	346	0.1	67%	<0.10-9.00	<b>2.80</b> $\pm$ 2.60	-	NB : ouvriers de l'industrie métallique	Céréales importées	(Khalef et al. 1993a)
Allemagne	1732	0.06	92%	<0.06-2.03	<b>0.23</b>	-	-	-	(Miraglia and Brera 2002)
Canada	144	0.15	100%	0.29-2.37	<b>0.88</b> $\pm$ 0.35	Urbain	Localisation géographique	Régime alimentaire (porc) et/ou Variabilité de la contamination	(Scott et al. 1998)
Croatie	983	0.20	48%	<0.20-15.90	<b>0.30</b>	Urbain	Région, Saison	Régime alimentaire (céréales, porc) Conditions climatiques saisonnières	(Peraica et al. 1999; Peraica et al. 2001)
Espagne	75	0.52	53%	<0.52-4.00	<b>0.71</b> $\pm$ 0.69	-	Mois de l'année	-	(Jimenez et al. 1998)
France	60	0.10	18%	0.10-11.80	<b>1.17</b> $\pm$ 1.55	Urbain et rural	Ruralité, Région	Régime alimentaire (bière, foie gras, magrets, volailles)	(Eko-Ebongue et al. 1994)
Grande-Bretagne	50	0.10	100%	0.40-3.11	<b>1.10</b> $\pm$ 0.34	Urbain	Âge	Moindre efficacité de l'élimination de l'OTA	(Gilbert et al. 2001; MAFF 1999)
Hongrie	355	0.20	82%	<0.20-10.00	-	-	-	-	(Solti et al. 1997)
Italie	137	0.10	97%	0.12-2.84	<b>0.56</b>	Urbain	(Sexe), Saison, Taille	Conditions climatiques particulières et variabilité saisonnière des régimes alimentaires	(Palli et al. 1999)
Japon	184	0.01	85%	<0.01-0.28	<b>0.07</b>	Urbain	-	-	(Ueno et al. 1998)
Liban	250	0.10	33%	0.10-0.87	<b>0.17</b> $\pm$ 0.01	Urbain et rural	Ruralité, Région	Régime alimentaire	(Assaf et al. 2004)
Maroc	309	0.10	60%	0.10-6.59	<b>0.29</b>	-	-	-	(Filali et al. 2002)
Norvège	206	0.01	100%	<0.01-0.78	<b>0.18</b> $\pm$ 0.11	-	Consommations alimentaires	Pain complet, Rôti de porc, Pâté de foie	(Thuvander et al. 2001)
Suède	297	0.30	13%	<0.3-6.7	-	Urbain	Localisation géographique	Régime alimentaire (céréales locales, porc)	(Breitholtz et al. 1991)
	200	0.01	100%	<0.01-1.23	<b>0.21</b> $\pm$ 0.17		Consommations alimentaires	Vin rouge, Biscottes	(Thuvander et al. 2001)
Suisse	368	0.01	100%	0.06-6.02	<b>0.39</b>	-	Localisation géographique (1) Sexe selon (1)	Régime alimentaire (céréales, café, raisin, vin, bière)	(Zimmerli and Dick 1995)
Turquie	40	0.20	100%	0.19-1.43	<b>0.44</b> $\pm$ 0.28	-	-	-	(Ozcelik et al. 2001)

**Tableau 5b** : Niveaux d'OTA plasmatique/sérique (ng/ml) et leurs déterminants dans quelques populations.

## Validité épidémiologique

Pour être valide, un marqueur biologique doit (Schulte and Talaska 1995) :

- (1) être biologiquement pertinent ;
- (2) être caractérisé sur le plan toxico-cinétique (Absorption, Distribution, Métabolisme, Elimination) ;
- (3) correspondre à une fenêtre d'exposition pertinente sur le plan de la pathogénèse ;
- (4) être caractérisé sur le plan des facteurs de variation et de confusion dans la population étudiée ;
- (5) présenter une bonne faisabilité dans sa mise en œuvre.

Le tableau 6 récapitule les principales données d'intérêt qui sont développées dans les paragraphes suivants.

Paramètre	OTA plasmatique	OTA urinaire	Référence
Toxico-cinétique	$t_{1/2}$ :36 jours <sup>a</sup> >95% : OTA-protéine (albumine) <5% : libre/érythrocytes	$t_{1/2}$ : non caractérisé OTA libre	(Schwerdt and al. 1999; Studer-Rohr et al. 2000)
LOD (ng/ml)	0.10	0.01	(Gilbert et al. 2001)
Étendue (ng/ml)	0.40-3.11	<0.01-0.058	
Facteurs de variation	(Âge) – Saison – Genre - Région Nyctémère	(Âge)	(Gilbert et al. 2001; Palli et al. 1999)
$r^b$ 2 mesures	0.05	-	(Palli et al. 1999)
$r^c$ OTA repas dupliqués	$r=0.25$	$r=0.52^*$	(Gilbert et al. 2001)
$CV_{inter}^d$	158%	154%	(Petkova-Bocharova et al. 2003)
$CV_{intra}^d$	45%	140%	

a : un volontaire ; b : coefficient de corrélation de Spearman ; c : coefficient de corrélation de Pearson ; d : nous avons calculé les  $CV_{inter}$  et  $CV_{intra}$  par décomposition de la variance à partir des données rapportées dans la publication citée, c'est-à-dire 5 prélèvements par personne à une semaine d'intervalle réalisés sur 16 personnes \* :  $p<0.05$ .

**Tableau 6** : Caractéristiques des indicateurs d'exposition à l'OTA.

### (1) Pertinence biologique

Le marqueur doit se trouver sur un continuum d'événements susceptibles de survenir entre l'exposition et les effets associés à cette exposition **(a)**. En outre, la corrélation entre un grand nombre de répliqués de la mesure du marqueur chez le même individu et la valeur vraie de l'exposition étudiée (ici les ingérés alimentaires usuels) doit approcher 1 **(b)**. Enfin, le marqueur devrait permettre de quantifier le niveau des ingérés alimentaires sur une échelle absolue, mais établit généralement un classement des individus selon leur niveau relatif d'exposition **(c)**.

**(a)** Dans le cas de l'OTA, c'est la toxine elle-même que nous proposons de doser dans le sang et les urines. L'OTA est expérimentalement plus toxique que ses métabolites identifiés (Dirheimer and Creppy 1991). Ceci peut être dû au fait qu'elle est éliminée plus lentement (demi-vie plus longue) (Li et al. 1997), qu'elle s'accumule dans les cellules rénales (Li et al. 2000; Li et al. 1997; Schwerdt et al. 1996), ainsi qu'à la relation structure-activité de la molécule dont la toxicité serait attribuable à la partie iso-coumarine et impliquerait également

le groupe carbonyl-lactone (Xiao et al. 1996). À la lumière de ces arguments, doser l'OTA native dans des matrices accessibles semble pertinent sur le plan biologique, même si on ne sait pas quelles fractions de l'OTA sérique et urinaire interagissent effectivement avec les tissus rénaux (dose biologiquement active). Notons que dans l'optique de pouvoir reconstituer les ingérés alimentaires davantage que de s'approcher de la dose biologiquement active, d'autres marqueurs pourraient être envisagés, tels que l'ochratoxine  $\alpha$  ( $O\alpha$ ), principal métabolite de l'OTA issu de l'hydrolyse de la toxine par la microflore intestinale *via* la carboxypeptidase (Madhyastha et al. 1992; Marquardt and Frohlich 1992), qu'on retrouve dans les urines chez le rat mais dont la demi-vie serait plus courte que celle de l'OTA (Li et al. 2000; Li et al. 1997). De plus, il n'est pas exclu que le métabolisme provenant d'analogues de l'OTA conduise à la formation d' $O\alpha$  (Hadidane et al. 1992), ce qui en fait un marqueur potentiellement peu spécifique de l'exposition considérée. Son utilisation nécessiterait donc une étape préalable de développement et de caractérisation qui n'est pas ici envisageable.

**(b)** La seule étude de validation utilisant la méthode des repas dupliqués comme étalon-or et réalisée dans des conditions quasi-expérimentales (Gilbert et al. 2001) a mis en évidence une meilleure corrélation entre OTA alimentaire (échantillon composite des repas dupliqués sur 30 jours) et OTA urinaire (échantillon composite de 5 prélèvements d'urines de 24h à intervalles d'une semaine,  $r=0.52$ ,  $p<0.05$ ) qu'avec l'OTA plasmatique (échantillon composite de 5 prélèvements de sang veineux à intervalles d'une semaine,  $r=0.25$ ,  $p>0.05$ ), allant dans le sens d'une meilleure pertinence biologique de l'OTA urinaire dosée dans ces conditions. Toutefois cette corrélation est trop faible pour être utilisée de manière prédictive.

**(c)** La quantification des ingérés est des plus pertinentes dans le cadre de la comparaison de la distribution des expositions à une valeur toxique de référence (DJT) ou pour la proposition d'une nouvelle valeur de référence à partir de résultats épidémiologiques. Consécutivement, des limites maximales de toxique peuvent également être proposées pour les principaux vecteurs alimentaires identifiés.

Dans le cas de l'OTA, Breitholtz et al. (1991) ont proposé d'utiliser la formule de (Klaassen 1986) pour convertir les données plasmatiques en ingérés alimentaires quotidiens :

$$K_o = \frac{C_{plasma} \cdot Cl_{plasma}}{A}$$

$C_{plasma}$  : concentration plasmatique  
 $Cl_{plasma}$  : clairance plasmatique  
 $A$  : biodisponibilité

$A$  s'élève à 50% chez la plupart des espèces animales. La clairance plasmatique est assimilée au taux de filtration rénal de l'OTA, lui-même estimé à 0.67ml/kg p.c./jour à partir du débit de filtration glomérulaire de l'inuline et de la fraction libre de l'OTA, soit un rapport  $Cl_{plasma}/A$  de 1.34 (Hagelberg et al. 1989). Dans ce cas, la clairance est susceptible d'être sous-estimée, puisque l'on considère que la seule voie d'élimination de l'OTA est la filtration rénale. Or il existe un facteur pouvant aller jusqu'à 10 entre la fraction d'OTA éliminée par cette voie chez le singe (100%) et chez le rat ou le porc (11 et 14% respectivement) (Hagelberg et al. 1989). Schlater et al. (1996) proposent quant à eux un rapport de 1.97 sur la base d'une donnée obtenue chez l'homme (clairance rénale de 0.99ml/kg p.c./jour (Studer-Rohr et al. 2000). Nous considérons ici que la clairance et la concentration sériques de l'OTA égalent la clairance et la concentration plasmatiques.

Concernant l'OTA urinaire, aucune relation quantitative avec les ingérés n'a été établie chez l'animal ni chez l'homme. Les données biologiques permettront donc au mieux de classer les

individus relativement à leur niveau d'exposition individuelle sans permettre de reconstituer les ingérés et de les comparer aux valeurs toxiques en vigueur.

### (2) *Toxico-cinétique*

La toxico-cinétique de l'OTA a été étudiée chez l'animal (Galtier 1991) mais reste encore largement inconnue chez l'homme. Des données expérimentales obtenues chez le rat et d'autres mammifères indiquent que l'OTA ingérée par voie alimentaire est absorbée passivement à travers le tractus gastro-intestinal (Kumagai and Aibara 1982) avec une biodisponibilité d'environ 50% (Hagelberg et al. 1989). Elle se retrouve dans la circulation générale majoritairement liée à des protéines de fort poids moléculaire telles que l'albumine sérique, avec une fraction libre inférieure à 0.2% (Hagelberg et al. 1989; Stojkovicacute and et al. 1984). Elle est également sujette à des phénomènes de sécrétion et de réabsorption intestinale *via* le cycle entéro-hépatique (Fuchs and al. 1988; Roth et al. 1988). L'OTA est filtrée par les glomérules rénaux puis sécrétée et réabsorbée activement le long du néphron (Dahlmann et al. 1998; Zingerle et al. 1997). L'excrétion urinaire est une voie d'élimination importante, de sorte que l'on retrouve des quantités détectables d'OTA dans les urines (Galtier et al. 1979; Kumagai 1985). Cependant, une part importante de l'OTA administrée n'est pas détectée sous la forme native ou de métabolites connus (OTA, O $\alpha$ , OH-OTA) (Li et al. 1997). Chez le rat, notamment, seulement 2 à 6% de la dose ingérée est retrouvée dans les urines sous forme d'OTA (Storen et al. 1982; Zepnik et al. 2003) et la part d'OTA éliminée *via* l'urine estimée à 48% (Li et al. 1997).

Ces observations amènent à envisager trois hypothèses non mutuellement exclusives :

- une autre voie d'élimination, par exemple la voie biliaire, existe voire prédomine chez certaines espèces (Hagelberg et al. 1989; Kuhn et al. 1995; Orti et al. 1986; Roth et al. 1988) ;
- l'OTA s'accumule dans l'organisme (Studer-Rohr et al. 2000), en particulier dans le sang et, quoique dans une moindre mesure, dans les cellules rénales ; cette accumulation s'explique par la liaison de l'OTA avec l'albumine sérique et d'autres protéines de fort poids moléculaire, la circulation entéro-hépatique et la réabsorption rénale (cf. supra) ;
- d'autres métabolites ou des formes conjuguées de l'OTA (conjugaison à l'acide glucuronique) sont présents dans les urines mais non détectés (Kamimura et al. 1992; Studer-Rohr et al. 2000; Zepnik et al. 2003).

### (3) *Fenêtre temporelle*

C'est en général l'ingestion passée ou long-terme qui est pertinente pour la mise en relation de l'exposition avec l'état de santé ou les effets précoces étudiés. Cependant, dans le cas d'expositions habituelles (relativement constantes au cours du temps) ou répétées, telles que le tabagisme et l'ingestion d'aflatoxines, un petit nombre de mesures chez un même individu d'un marqueur à court ou moyen terme peut fournir une estimation raisonnable de l'exposition sur le long-terme (Coggon and Friesen 1997).

Dans le cas de l'OTA, le délai entre la survenue de l'exposition et la survenue d'effets toxiques susceptibles d'être détectés *via* la protéinurie et l'enzymurie demeure inconnu, si tant est que ces effets soient observables chez l'homme et prédictifs d'une évolution vers un état pathologique. En posant l'hypothèse d'une exposition relativement constante au cours du temps (en dehors des variations saisonnières et séculières de régime alimentaire et des niveaux de contamination des denrées), l'exposition usuelle serait le paramètre à estimer. Un marqueur à court-moyen terme mesuré à différentes saisons ou un marqueur long terme mesuré une seule fois seraient alors pertinents.

Chez l'animal, la demi-vie après administration *per os* varie entre 41 min. chez le poisson et 21 jours chez le singe (Hagelberg et al. 1989). Chez l'homme, (Studer-Rohr et al. 2000) rapportent une demi-vie sérique d'environ 36 jours. Ce résultat provient d'une expérience réalisée chez un seul volontaire ayant ingéré de l'OTA marquée dissoute dans un solvant (ce qui peut en modifier la biodisponibilité) et ne saurait constituer à elle seule une validation de la fenêtre temporelle d'exposition à laquelle se rapporte le marqueur. Toutefois, en première approximation, on considère que la demi-vie probable de l'OTA chez l'homme est comprise entre 20 et 50 jours, proche de celle du singe.

Palli et al. (1999) considèrent l'OTA sérique comme un marqueur à court-moyen terme qui manifeste une forte variabilité intra-individuelle (corrélation quasi-nulle entre deux mesures chez un même individu à un an d'intervalle). Cette mesure serait donc difficilement interprétable en terme d'exposition individuelle mais pourrait permettre de caractériser des groupes particuliers dans le cadre d'études épidémiologiques prospectives.

Bien qu'aucune donnée relative à la demi-vie et la variabilité intra-individuelle de l'OTA urinaire n'ait à ce jour été publiée, les résultats de Gilbert et al (2001) suggèrent que l'OTA dosée dans un échantillon composite d'urines de 24h prélevées sur un période d'un mois à intervalles réguliers reflète les ingérés du mois passé (cf. corrélation statistiquement significative de 0.52, tableau 6). Les auteurs concluent que l'OTA urinaire présente un intérêt considérable en tant que marqueur d'exposition, si tant est que sa variabilité temporelle soit plus complètement caractérisée.

#### *(4) Facteurs de variation*

Les sources potentielles de variation des concentrations de marqueurs biologiques (variations vraies et erreurs de mesure) sont au nombre de quatre (Vineis 1997) :

- (a) La variabilité inter-individuelle ;
- (b) La variabilité intra-individuelle ;
- (c) La variabilité d'échantillonnage ;
- (d) La variabilité analytique.

#### *(a) Variabilité inter-individuelle*

La variabilité inter-individuelle est liée aux effets du régime alimentaire, de la région de résidence, du genre, de l'âge, du poids corporel, et de l'origine ethnique (polymorphisme des enzymes intervenant dans la détoxification et l'élimination des xénobiotiques) sur le niveau d'ingestion et le devenir de la toxine dans l'organisme. Afin d'augmenter les chances d'observer une association entre l'exposition et les effets étudiés, il est important de constituer un échantillon contrasté au regard des niveaux d'exposition, c'est-à-dire d'obtenir une variabilité inter-individuelle la plus grande possible au sein de l'échantillon d'étude, toutes choses étant comparables par ailleurs afin d'éviter les biais différentiels de sélection et d'information. À partir des résultats de Petkova-Bocharova et al. (2003), nous avons estimé une variabilité inter-individuelle importante ( $CV_{\text{inter-individus}}$  de 158 et 154% respectivement pour l'OTA sérique et urinaire) chez 16 personnes résidant dans une région de Bulgarie où la NEB sévit de manière endémique, indiquant une forte variabilité de l'exposition à l'OTA, dans certaines populations au moins.

Palli et al (1999) ont mis en évidence sur un échantillon de 137 sérums que les niveaux d'OTA étaient significativement plus élevés chez les hommes que chez les femmes et étaient positivement corrélés à la taille. Les échantillons prélevés en été présentaient par ailleurs des niveaux supérieurs à ceux prélevés en hiver. Un phénomène saisonnier similaire, portant à la fois sur la prévalence et la concentration d'OTA dans le sang, avait été décrit par Hald (1991) sur un échantillon de 144 sérums humains au Danemark, par Golinski et al. (1991) sur 1065 sérums humains en Pologne et par Frohlich et al. (1991) et Ominski et al. (1996) sur près de

1800 sérums de porc au Canada. L'effet de l'âge n'était pas significatif (3 groupes d'âge) dans l'étude de Palli et al (1999), alors que Gilbert et al (2001) ont détecté sur un échantillon de 50 sujets une tendance à l'augmentation des niveaux d'OTA plasmatique avec l'âge, ainsi qu'une tendance à la diminution de l'OTA urinaire. Ces tendances inverses sont toutefois non statistiquement significatives, ce qui peut être dû au petit nombre d'échantillons analysés. Elles pourraient notamment s'expliquer par une diminution de l'efficacité de l'élimination rénale de l'OTA avec l'âge.

#### *(b) Variabilité intra-individuelle*

La variabilité intra-individuelle correspond :

- aux variations physiologiques (liées à l'état de santé, au nyctémère) de l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'élimination de la toxine.
- aux variations temporelles des ingérés, liées aux variations saisonnières et calendaires des niveaux de contamination des aliments consommés et du régime alimentaire ;

Lorsque la variabilité intra-individuelle est élevée par rapport à la variabilité inter-individuelle, la mesure du marqueur n'est pas représentative de l'exposition long-terme et le marqueur ne peut pas être considéré comme valide, ne permettant pas de discriminer les sujets en fonction de leur niveau usuel d'exposition.

Studer-Rohr et al (2000) ont mis en évidence une variabilité intra-individuelle importante (d'un facteur 1.2 à 3) des niveaux plasmatiques chez six des huit volontaires suivis sur une période de deux mois. De même, Palli et al (1999) ont trouvé une corrélation quasi-nulle entre 68 paires d'échantillons de sérum prélevés chez les mêmes individus à un an d'intervalle. Aucun élément d'interprétation n'est toutefois fourni, de sorte que cette variabilité pourrait être d'origine exogène (variation de la diète individuelle et des niveaux de contamination) ou endogène (variation physiologique du métabolisme et de l'élimination de l'OTA). En revanche Gilbert et al (2001) trouvent un coefficient de corrélation de 0.73 entre les niveaux d'OTA dosés dans un échantillon composite de quatre plasmas prélevés à une semaine d'intervalle et dans un échantillon de plasma prélevé un mois avant le premier des prélèvements de l'échantillon composite, ce qui va plutôt dans le sens d'une faible variabilité intra-individuelle à cette échelle de temps. Ceci pourrait s'expliquer par une exposition alimentaire relativement constante au cours de la période d'étude (deux mois) assortie d'une variabilité endogène faible dans le groupe étudié. De même, à partir des données du suivi de 16 personnes résidant dans une région de Bulgarie où la NEB sévit de manière endémique (Petkova-Bocharova et al. 2003), nous avons estimé à 45% seulement le  $CV_{\text{intra-individu}}$  de l'OTA sérique, bien plus bas que celui obtenu dans la même étude pour l'OTA urinaire (140%). Aucune autre étude ne permet à ce jour de caractériser la variabilité intra-individuelle (circadienne, saisonnière) de l'OTA urinaire, les données de Gilbert et al. (2001) n'ayant pas été publiées sous leur forme désagrégée.

#### *(c) Variabilité d'échantillonnage*

La variabilité de l'échantillonnage est liée au moment (variations circadiennes), aux modalités (position du sujet), et au site histologique où le prélèvement est effectué (en particulier pour les cellules muqueuses). Elle peut introduire de la variabilité intra-individuelle ou inter-individuelle si les prélèvements ne sont pas effectués dans des conditions standardisées.

Cette question est particulièrement sensible pour ce qui est des urines. La collecte des urines de 24h est logistiquement lourde et très contraignante pour les participants. Elle n'est pas envisageable dans le cadre de notre étude et risquerait d'engendrer des biais de mesure importants en raison de collectes incomplètes ou incorrectes (K/DOQI 2002). Un spot des secondes urines du matin sera récolté. Or les variations possibles de l'élimination urinaire de l'OTA au cours du nyctémère demeurent inconnues.

#### *(d) Variabilité analytique*

Il peut exister une variabilité entre les lots (« between-batch ») et au sein d'un même lot (« within-batch ») d'échantillons analysés. Elle résulte des variations de préparation, de stockage et/ou de conditions d'analyse (expérimentateur, réactifs) pour les différents échantillons d'un même individu (introduisant une erreur dans la mesure de la variabilité intra-individuelle) ou d'individus différents (introduisant une erreur dans la mesure de la variabilité inter-individuelle). Cet aspect est abordé au paragraphe relatif à la validation de la méthode de dosage de l'OTA dans les matrices biologiques. L'urine et le sérum sont des matrices complexes et riches en protéines, c'est pourquoi l'étape d'extraction est critique. De plus, les teneurs urinaires étant généralement très basses (de l'ordre de quelques dizaines de ppb), les limites de détection doivent être très sensibles, notamment grâce à l'étape de purification (Valenta 1998).

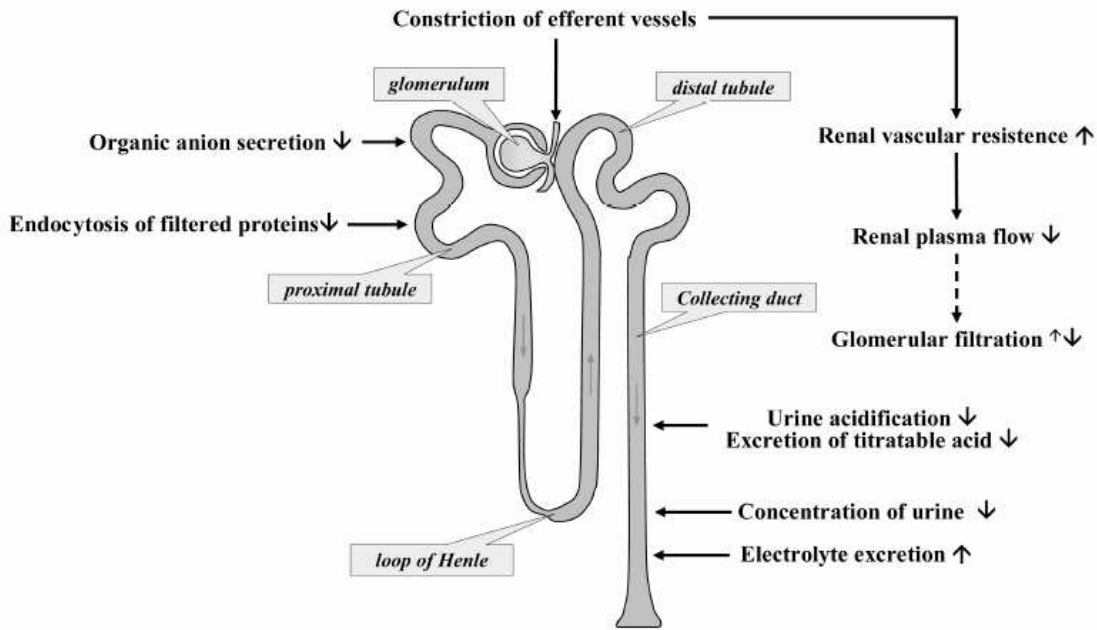
#### *(5) Faisabilité*

La faisabilité de l'utilisation d'un marqueur biologique dépend de l'acceptabilité des prélèvements biologiques par les sujets se prêtant à la recherche, du coût et du temps nécessaire à l'analyse de chaque échantillon (Schulte and Perera 1997) et des exigences pratiques liées aux conditions du terrain et aux contraintes analytiques (fragilité des spécimens/analytes et difficultés de conservation). Le recueil des secondes urines du matin est en général considéré comme aisé et acceptable. Le recueil d'un petit échantillon de sang veineux est quant à lui généralement moins largement accepté et requière le savoir-faire de personnels paramédicaux.

### II.4.2 Indicateurs d'effets toxiques rénaux

#### Sites d'action de l'OTA

Les études de néphrotoxicité expérimentale réalisées chez différentes espèces mammifères *in vivo* et *in vitro* ont révélé que le site d'action et la nature des effets toxiques induits par l'OTA dépendaient de la voie, de la dose, et de la durée d'exposition (Gekle and Sildernagl 1996). Des altérations structurales et fonctionnelles ont été majoritairement observées au niveau du tube contourné proximal (Gekle and al. 1998; Jung and Endou 1989; Krogh and al. 1974) et du tube collecteur (Gekle et al. 2005) à des doses (sub-)chroniques, notamment une perturbation de la sécrétion des anions organiques et une augmentation de l'excrétion urinaire des protéines. Les paramètres clés de la néphropathie interstitielle chronique ont pu être induits *in vitro* sur des cellules du tubule proximal (Sauvant et al. 2005). Toutefois, des effets post-proximaux ainsi qu'une réduction du débit de filtration glomérulaire ont pu être observés dans certains cas (Gekle et al. 2005; Gekle and Sildernagl 1994). La Figure 2 illustre les différents segments du néphron et les effets de l'OTA s'y manifestant à faibles doses.



**Figure 2** : Altérations fonctionnelles rénales induites par une exposition chronique à l'OTA (Gekle et al. 2005).

#### Choix des indicateurs de néphrotoxicité

Un certain nombre de marqueurs urinaires de néphrotoxicité ont été développés et sont utilisés depuis plusieurs décennies en épidémiologie des risques professionnels et environnementaux (Lauwerys et al. 1992; Mueller et al. 1997; Roels et al. 1999). Les profils urinaires protéiques et enzymatiques varient en fonction de la toxine incriminée et reflètent à la fois la région fonctionnelle du rein affectée et la gravité des lésions structurelles et/ou fonctionnelles. La sensibilité de certains marqueurs permet en outre de détecter des effets précoces, avant toute manifestation clinique (Price 2000).

Deux limitations principales rendent cependant difficile l'interprétation des analyses urinaires : (a) l'absence relative de spécificité d'un marqueur vis-à-vis d'une exposition : spécificité d'atteinte mais pas de toxine ; (b) leur faible valeur prédictive (ou son caractère inconnu) d'une progression vers une affection rénale pouvant faire l'objet d'un diagnostic clinique. Or pour être validé comme biomarqueur d'effet précoce, le paramètre biochimique mesuré doit réellement se trouver sur la chaîne de pathogenèse et ne pas résulter d'une simple réponse adaptative. Seules l'albumine et la  $\beta$ 2-microglobuline urinaires ont été validées comme ayant une valeur prédictive positive satisfaisante.

Pour ces différentes raisons, nous préférons utiliser un petit nombre de marqueurs soigneusement choisis permettant d'explorer l'existence d'une lésion rénale, sa nature (structurelle, fonctionnelle), la principale région affectée (glomérule, tube contourné proximal ; il n'existe cependant pas à ce jour de marqueur de lésions interstitielles ni de marqueur véritablement spécifique de la région distale du tube contourné) et la gravité des effets néphrotoxiques induits (Mueller and al. 1997). L'utilisation d'une batterie minimale de marqueurs permet à la fois d'améliorer la valeur prédictive positive du test et de minimiser la proportion de faux positifs et de faux négatifs qui biaisent les résultats (Price and al. 1997).

Une revue de la littérature nous dirige ainsi vers deux séries de tests (Price and al. 1997; Price 2000) :

- Deux tests à valeur diagnostic :
  - Les bandelettes urinaires : protéinurie totale (« dipstick positive proteinuria » : indicateur d'une affection rénale détectable sur le plan clinique), densité urinaire, glucosurie (indicateur d'un diabète « sucré »), hématurie et leucocyturie (suspicion d'infection urinaire) ;
  - La créatinine sérique : marqueur de la fonction rénale indiquant une insuffisance rénale chronique débutante ou modérée ; en effet, la créatininémie permet d'obtenir une estimation (Cockcroft and Gault 1976) de la clairance de la créatinine qui reflète le débit de filtration glomérulaire (DFG ou GFR), principal paramètre de la fonction rénale en pratique clinique (K/DOQI 2002) ;
- Une batterie de quatre tests urinaires classiques, assez sensibles pour permettre la détection de manifestations toxiques spécifiques de différents segments du néphron (marqueurs précoces de « lésions » ou d'« atteintes » rénales) :
  - Une protéine de fort poids moléculaire, marqueur de l'intégrité glomérulaire : l'albumine ( $\mu$ ALB) ;
  - Un enzyme marqueur de l'intégrité tubulaire : la N-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG) ;
  - Une protéine de faible poids moléculaire, marqueur de réabsorption et de sécrétion tubulaire : la Retinol Binding Protein (RBP) ;
  - Une autre protéine de faible poids moléculaire à sécrétion tubulaire : la  $\beta$ 2-microglobuline ( $\beta$ 2M).

Les marqueurs d'atteintes tubulaires (NAG, RBP et  $\beta$ 2M) ne concernent que le tube contourné proximal.

### Albumine

L'albumine, protéine de forte masse moléculaire (68 000), est normalement faiblement filtrée à travers le glomérule rénal. Aussi, une élévation de l'albumine urinaire indique-t-elle une augmentation de la perméabilité glomérulaire en l'absence d'un phénomène de réduction de la réabsorption tubulaire de l'albumine. Principale protéine plasmatique filtrée par le glomérule se retrouvant dans les urines, l'albumine constitue un marqueur de lésion rénale au même titre que la protéinurie totale, quoique plus sensible et spécifique des atteintes liées au diabète (K/DOQI 2002). En particulier, le dosage de la micro-albuminurie ( $\mu$ ALB) permet de détecter une protéinurie « pathologique » comprise entre 30 et 300 mg/g créatinine que la plupart des bandelettes ne détecte pas (macro-albuminurie détectée par bandelette réactive correspondant à des concentrations en albumine de plus de 300 mg/g créatinine).

### N-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminidase

La N-acétyl- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG) est un enzyme lysosomal des cellules tubulaires rénales qui intervient dans le catabolisme des glycoprotéines. Les valeurs basses retrouvées dans les urines de personnes en bonne santé correspondent l'activité normale d'exocytose et de pinocytose des cellules épithéliales. En revanche, une élévation de l'activité de la NAG dans les urines est un indicateur sensible de la présence de lésions tubulaires (Price 1992).

## β2-microglobuline et Retinol Binding Protein

La β2-microglobuline (β2M), protéine de faible masse moléculaire (11 800), fait partie des antigènes membranaires du CMH et voit son excrétion augmenter en cas de lésions tubulaires (Bernard and Lauwerys 1991). Ce marqueur est très sensible aux atteintes du tubule proximal car elle est normalement réabsorbée à 99.97% dans cette région du néphron ; une augmentation de 0.1% de la capacité de réabsorption du tubule proximal implique donc une multiplication par trois des teneurs excrétées. Ceci en fait un outil de dépistage largement utilisé depuis plus de 10 ans. La β2-microglobuline est cependant très instable aux pH acides qui caractérisent souvent les urines, et on lui préfère actuellement la RBP en dépit du caractère incomplet de sa validation (Price and al. 1997). Elle sera néanmoins dosée afin de pouvoir comparer nos résultats aux études antérieures, notamment concernant le diagnostic de la NEB (Néphropathie Endémique des Balkans, (Hrabar et al. 1991; Hrabar et al. 1991; Jevremovic et al. 1991; Rashad et al. 1991; Stefanovic et al. 1991), les effets néphrotoxiques du cadmium (Hotz et al. 1999; Ikeda et al. 1995; Jin et al. 2002; Nakadaira and Nishi 2003) et plus récemment de l'exposition à l'OTA (Abid et al. 2003; Hassen et al. 2004).

La rétinol-binding protein (RBP) a pour fonction de transporter la vitamine A depuis le foie jusqu'aux cellules épithéliales sous la forme d'un complexe tri-moléculaire prévenant ainsi l'élimination de la vitamine dans les urines. La fraction libre de la RBP est, comme la β2M, de faible masse moléculaire (2 100) et réabsorbée à 99.97% le long du tubule proximal en l'absence de lésions. De plus, cette protéine est stable aux pH acides généralement rencontrés dans les urines et ne nécessite donc pas de précautions particulières lors du prélèvement.

## Créatinine urinaire

La concentration protéique des urines étant affectée par le volume urinaire et par le taux d'excrétion protéique, la créatininurie sera également déterminée afin d'obtenir une estimation de la concentration/dilution des urines et d'y rapporter les résultats des analyses biochimiques (μg/g créatinine ou UI/g créatinine) (K/DOQI 2002).

## Valeurs 'normales' en population générale

Afin de pouvoir interpréter les variations de protéinurie et d'enzymurie attendues dans l'échantillon d'étude, il est nécessaire de connaître l'étendue des valeurs considérées comme « normales » dans la population étudiée, en dehors de toute manifestation infra-, sub-clinique ou clinique. Le tableau 7 présente à titre indicatif quelques valeurs usuelles rencontrées en population générale européenne et américaine.

Analyte urinaire	Médiane (intervalle de fluctuation à 95%)	Unité	Référence
Créatinine	6 à 12	mg/l	(Boege 1998)
Albumine	<300	mg/g créatinine	(American Diabetes Association 2001)
β2-microglobuline	<0.300	mg/g créatinine	(Bernard et al. 1997)
RBP	<1.18 (femmes) <1.06 (hommes)	U/mmol créatinine	(Jung et al. 1992)
NAG	<8.2 (femmes) <5.8 (hommes)	U/g créatinine	(Boege 1998)

**Tableau 7 :** Valeurs usuelles des paramètres urinaires.

## Validité épidémiologique

### *(1) Sensibilité et spécificité*

Un marqueur est dit sensible lorsqu'une petite variation du niveau d'exposition induit une variation détectable du marqueur d'effet mesuré. Il est dit spécifique (de l'exposition étudiée) lorsque ses variations reflètent celles du niveau d'exposition indépendamment d'expositions concomitantes ayant pour cible le même tissu/organe/fonction.

Les concentrations urinaires des marqueurs de néphrotoxicité choisis varient en fonction de la toxine incriminée et reflètent à la fois la région fonctionnelle du rein affectée et la gravité des lésions structurelles et fonctionnelles. Leur sensibilité permet en outre de détecter des effets précoces, avant toute manifestation clinique (Price 2000). Toutefois, ces marqueurs n'ont encore jamais été mis en relation avec l'exposition à l'OTA dans une population apparemment bien portante, à l'exception de la  $\beta$ 2-microglobuline dans un petit groupe de sujets tunisiens témoins (Hassen et al. 2004). Une des limitations principales de ces marqueurs rénaux est à ce titre l'absence relative de spécificité vis-à-vis de l'exposition : il s'agit d'une spécificité d'atteinte, mais pas de toxine. Dans certains cas, comme pour le cadmium, le plomb et le mercure, Price (2000) note cependant qu'il est possible d'identifier des profils enzymatiques et protéiques spécifiques des atteintes d'un toxique donné.

### *(2) Pertinence biologique*

L'autre limitation majeure de ces marqueurs est leur faible valeur prédictive (ou son caractère inconnu) d'une progression vers une affection rénale pouvant faire l'objet d'un diagnostic clinique. Or pour être validé comme marqueur biologique d'effet, le paramètre biochimique mesuré doit (a) se trouver directement sur la chaîne de pathogenèse reliant exposition et maladie, et ne pas résulter d'une simple réponse adaptative ; (b) être un substitut reflétant des mécanismes biologiques similaires ; ou (c) représenter un mécanisme n'étant pas directement impliqué dans la toxicité mais corrélé à la voie d'action du toxique considéré (Rothman et al. 1995; Schatzkin et al. 1990; Schulte 1989). Nombre des études ayant utilisé des marqueurs d'effets rénaux précoces se sont limitées à une signification très "physiologique" dans le cadre d'études transversales. La valeur prédictive des marqueurs par rapport à l'évolution vers des pathologies rénales à long terme a été beaucoup plus rarement étudiée et prise en compte. Ainsi, seules ont été validées comme ayant une valeur prédictive positive satisfaisante, la microalbuminurie pour les atteintes glomérulaires liées au diabète : néphropathie diabétique (Mogensen 1995; Mogensen and Christensen 1984; Parving and al. 1982; Viberti and al. 1982) et la  $\beta$ 2-microglobuline ainsi que la RBP urinaires pour les atteintes tubulaires liées à l'exposition chronique au cadmium (Bernard et al. 1997; Nishijo and al. 1994; Nishijo et al. 1994). Pour ces deux marqueurs, la validation a consisté en la répétition d'études transversales et en la réalisation d'études longitudinales permettant d'étudier la force et la significativité statistique des corrélations entre les niveaux de biomarqueurs et le déclin de la fonction rénale.

### *(3) Facteurs de variation et de confusion*

Certains facteurs physiologiques (âge, sexe, corpulence, diurèse, rythme circadien, pH urinaire, tension artérielle systolique et diastolique, masse musculaire, activité physique) et certaines conditions pathologiques (diabète, hypertension artérielle, prise de médicaments néphrotoxiques) sont bien connus pour leurs effets sur l'excrétion urinaire des marqueurs de toxicité rénale (Bernard and Lauwerys 1989; Bernard and Lauwerys 1991; Bianchi et al. 1999; Burchardt and Jung 1992; Jung et al. 1992; Kohno et al. 1985; Mogensen 1987). Ils peuvent être contrôlés à l'étape du protocole grâce à la standardisation des méthodes et à l'exclusion de certains sujets. D'autres facteurs tels que le tabac, la consommation d'alcool et la prise de médicaments d'usage courant introduisent également de la variabilité dans les

mesures de marqueurs. Dans l'ensemble, ces facteurs expliqueraient de 13 à 21% de la variance des mesures urinaires (Stengel et al. 1995). La composante génétique pourrait aussi expliquer une part importante de la variance, jusqu'à 50% pour ce qui est de l'excrétion urinaire des enzymes lysosomiaux (Paigen and al 1984).

Par ailleurs, l'excrétion des protéines de forte comme de faible masse moléculaire est accrue durant la grossesse en raison de la diminution de la réabsorption tubulaire (Cheung et al. 1989; Hultberg et al. 1989; Skrha et al. 1989), c'est pourquoi nous décidons d'exclure les femmes gestantes de l'échantillon d'étude.

La variabilité intra-individuelle est inégalement documentée : un seul dosage de  $\beta$ 2-microglobuline était représentatif de l'exposition environnementale moyenne au cours des trois dernières années dans un groupe de sujets japonais (Ariwasa and al. 1997) mais la reproductibilité à court terme était faible chez les employés français d'une imprimerie (Stengel et al. 1995). Dans la même étude, la reproductibilité de la microalbumine était élevée ( $r=0.75$ ) et celle de la NAG moyenne ( $r=0.51$ ). Enfin, Mason rapporte une variabilité intra-individuelle de 40% des dosages de RBP dans des spots urinaires obtenus sur une semaine chez des sujets avec ou sans protéinurie (Bernard et al. 1997). Stengel et al. (1999) concluent à propos de la microalbumine et de la NAG que bien que les variabilités intra- et inter-individuelles soient presque égales chez des sujets en bonne santé, il n'est pas nécessaire de répéter systématiquement les mesures dans le cadre d'études épidémiologiques, sauf quand le nombre de sujets est limité et que la puissance de l'étude en est réduite. Le suivi des participants pendant deux vagues d'enquête réalisées à deux saisons différentes devrait nous permettre d'appréhender cette variabilité intra-individuelle à l'échelle de quelques mois.

## II.5 Recueil des informations individuelles

### II.5.1 Questionnaires administrés par un enquêteur

#### Type de questionnaires

Des données nominatives vont être collectées afin de procéder à l'inclusion des participants, d'interpréter les résultats et de se prémunir contre un certain nombre de biais d'information. Trois types de questionnaires sont soumis aux participants par un enquêteur :

- Questionnaire d'inclusion et médical ;
- Questionnaire socioprofessionnel et habitudes de vie ;
- Questionnaires fréquence et habitudes alimentaire.

La passation de questionnaires par le biais d'une interview face-à-face (enquêteur-enquêté) est une méthode courante en épidémiologie (Armstrong et al. 1992). Elle est rendue ici indispensable par le caractère rural de la population d'étude et le taux d'alphabétisation global de 75.3% en 2002 qui cache des disparités fortes entre milieu rural et urbain, surtout en ce qui concerne notre population d'étude âgée de 18 ans et plus.

La présence d'un enquêteur présente l'avantage de favoriser la participation de la personne interrogée, de minimiser le nombre d'items sans réponse, de limiter les problèmes de compréhension liés à une éventuelle ambiguïté ou complexité des questions, et globalement de recueillir plus d'information et sur des aspects plus complexes que ne le permet généralement un questionnaire auto-administré (Armstrong et al. 1992). Cependant, outre le biais de mémoire propre à toute approche rétrospective, la présence d'un enquêteur introduit

deux sources d'erreurs potentielles : un biais d'information lié au caractère de « désirabilité sociale » de certaines questions (consommation de tabac, d'alcool, d'aliments) et une influence involontaire mais réelle de l'enquêteur sur le comportement et les réponses de la personne enquêtée (Armstrong et al. 1992). De plus, cette approche est plus coûteuse et nécessite la formation des enquêteurs aux objectifs et méthodes de l'étude.

## Contenu des questionnaires

### (1) Questionnaire d'inclusion et médical (Annexe 2)

Les principaux facteurs d'inclusion et de non inclusion sont renseignés : âge, sexe, lieu(x) de résidence (5 dernières années), diabète, affection uro-néphrologique, infection urinaire. Le consentement écrit est sollicité en cas d'éligibilité. Des données anthropométriques de base (taille, poids, tension artérielle) ainsi que l'état de santé et les facteurs de variation physiologiques et individuels qui influent sur le niveau d'excrétion des marqueurs urinaires (Ariwasa and al. 1997; Stengel et al. 1995; Stengel et al. 1999) sont consignés en cas d'inclusion effective, notamment : prise de médicaments néphrotoxiques, hypertension artérielle connue et traitée (HTA) et antécédents familiaux.

### (2) Questionnaire socioprofessionnel et habitudes de vie (Annexe 3)

Le questionnaire comporte notamment les items : âge, sexe, situation et activité professionnelle (catégories établies à partir de l'enquête nationale sur le budget, la consommation et le niveau de vie des ménages (Institut National de la Statistique 1998)), niveau d'instruction (catégories établies à partir du rapport national sur le développement du système d'éducation en Tunisie (République Tunisienne 2000)), consommation de tabac et utilisation de produits de beauté traditionnels : kohl pour le maquillage des yeux et « mardouma » pour la teinture des cheveux (fait de clous de girofle, huiles et préparations végétales appelées « zizia »), tous deux sources significative d'exposition au plomb chez la femme, parfois depuis l'enfance (Al-Ashban et al. 2004; Lekouch et al. 2001; Parry and Eaton 1991)).

### (3) Questionnaires fréquence et habitudes alimentaire (Annexe 4)

Nous souhaitons évaluer la cohérence des deux approches d'évaluation de l'exposition : l'approche « biologique » et l'approche « alimentaire ». Nous avons vu qu'il n'était pas envisageable ici de réaliser une enquête alimentaire quantitative avec carnet alimentaire ou rappels de 24h et plan d'échantillonnage alimentaire complet pour le dosage de l'OTA, incluant les différents circuits d'approvisionnement des ménages. Cependant, nous proposons d'établir un score individuel d'exposition dont le calcul requiert deux types de données : fréquence de la consommation des aliments vecteurs, et niveau de contamination des aliments consommés.

Pour ce faire, un questionnaire de fréquence simple informe sur la fréquence de consommation des aliments courants dans la population d'étude. Son élaboration est présentée au paragraphe suivant. Il porte sur le mois précédent l'étude. Les modes et voies d'approvisionnement alimentaires (auto-consommation, petits commerces de proximité, coopératives), les conditions de stockage des matières premières et des produits consommés (containers, durée, saison), et la fabrication et conservation d'aliments traditionnels spécifiques identifiés comme vecteurs potentiels d'OTA (bsissa, tchiche, boissons spécifiques) sont également renseignées par chaque ménage enquêté. Ces informations doivent contribuer à identifier les deux vecteurs d'OTA les plus consommés par chaque ménage en vue de leur prélèvement et de leur analyse et permettre de vérifier les hypothèses que nous avons formulées pour l'identification des groupes d'exposition *a priori*. L'utilisation

de vaisselle émaillée est également renseignée dans la mesure où les vernis utilisés contiennent fréquemment du plomb susceptible d'être transféré dans les aliments en fonction de leur acidité et du mode de préparation (Acra et al. 1981; Belgaied 2003; Gonzalez de Mejia and Craigmill 1996).

### Élaboration du questionnaire de fréquence alimentaire

(Willet 1998) décrit et discute différentes approches dans la conception d'un questionnaire de fréquence alimentaire. Le développement d'un questionnaire *de novo* est une entreprise longue, complexe et coûteuse. Il peut donc être avantageux d'utiliser ou de modifier un questionnaire établi à d'autres fins. Un questionnaire de fréquence est actuellement en cours de validation dans le cadre du projet Tahina (Nguyen-Thanh 2003; Tahina Project 2005). Outre le choix de la période de consommation à laquelle se rapportent les questions (généralement des mois précédant l'enquête à l'année passée), l'élaboration du questionnaire repose sur quatre dimensions, tel que discuté par Willett (1998).

#### (1) *Choix des items alimentaires*

Il s'agit de choisir les groupes d'aliments, les items alimentaires de chaque groupe, et leur spécification (intitulés). Un item alimentaire apporte de l'information (est discriminant) par rapport à la question posée si :

- Il est consommé relativement souvent par une proportion non négligeable de la population étudiée ;
- Sa composition est telle que la substance étudiée (nutritionnelle ou non) y est présente en quantité significative ;
- La fréquence de sa consommation varie entre les personnes interrogées.

Un autre critère de choix est l'existence d'une hypothèse préalable sur le lien entre la consommation de cet aliment, l'exposition et l'affection étudiées.

Nous nous fondons sur deux questionnaires validés en population française (Clavel-Chapelon 1997; Hercberg et al. 1998), sur des données de consommation alimentaire des ménages tunisiens (Institut National de la Statistique 1998) et sur une liste d'aliments spécifiques à la diète tunisienne (Nguyen-Thanh 2003). Nous incluons tous les groupes alimentaires de la diète totale (11 groupes) afin de vérifier la cohérence globale des déclarations. En tout, 80 items alimentaires sont proposés.

#### (2) *Choix des mesures de fréquence*

Généralement, 5 à 10 catégories de fréquence (question à choix multiples) permettent de réduire l'erreur d'estimation qu'une question de type ouvert introduirait. L'interrogation par occasion de consommation (repas et autres) allonge considérablement la durée de passation du questionnaire sans garantir d'amélioration dans la précision des informations rapportées. Dix catégories de fréquence de consommation sont retenues, de « jamais » à « 4 fois par jour et plus ».

#### (3) *Choix des tailles de portion*

L'interrogation sur la taille des portions couramment consommées par les participants peut s'envisager sous trois angles :

- Renseignée par le participant (questionnaire quantitatif) : à partir d'un cahier de photographies avec des questions à choix multiple (notamment tailles de portion

intermédiaires à celles des photos); à partir de modèles réalistes ('portions-type' d' 'aliments-type' en plastique) ou sous forme d'une question ouverte ;

- À partir de portions standard (questionnaire semi-quantitatif) : unités « naturelles » (une tranche de pain, un œuf, une tasse de café) ou ménagères (plus difficiles à standardiser au vu de la forte variabilité intra-individuelle de la taille des portions) ;
- Sans recueil d'information sur la taille des portions (pondération par la fréquence).

Pour la plupart des aliments, la fréquence de consommation renseigne davantage sur la variabilité inter-individuelle des ingérés que la taille des portions, ce qui revient à dire que la plus grande partie de la variabilité inter-individuelle des consommations alimentaires est expliquée par le facteur « fréquence », pas par le facteur « taille ». De plus, la forte variabilité intra-individuelle généralement observée dans la taille des portions remet en cause la notion même de portion « usuelle ». Pour cette raison et par souci de simplicité dans l'implémentation des questionnaires, nous n'incluons aucune question relative à la taille de portion et attribuons des « poids » proportionnels à la fréquence de consommation.

#### *(4) Calcul des ingérés*

Le calcul des ingérés, qu'il conduise à une estimation quantitative de l'exposition ou à l'établissement d'un score individuel d'exposition, ce qui est ici notre cas, implique de croiser les données de fréquence de consommation des items du questionnaire avec des données de composition (ici contamination) des mêmes items. Le paragraphe II.5.2 présente la stratégie adoptée pour la partie contamination en OTA de cette étude. Le paragraphe suivant résume le principe de calcul du score d'exposition à l'OTA.

#### Score d'exposition à l'OTA

Nous établissons un score individuel d'exposition à l'OTA basé sur :

- D'une part, pour les deux items prélevés et analysés par ménage, la multiplication des fréquences individuelles de consommation des items alimentaires par la concentration en OTA dosée dans ces items ;
- D'autre part la pondération des fréquences de consommation des items non prélevés et analysés mais vecteurs d'OTA en fonction de leur probabilité de contamination et du niveau moyen de contamination suggérés par la littérature scientifique.

Le score individuel d'exposition est alors obtenu par sommation des deux types de scores sur l'ensemble des items vecteurs d'OTA dont la consommation est renseignée.

#### II.5.2 Prélèvements alimentaires

Deux échantillons alimentaires sont prélevés par ménage pour l'analyse de l'OTA. La variabilité des résultats d'un dosage de mycotoxines dans une matrice alimentaire dépend largement de l'étape d'échantillonnage, et généralement dans une moindre mesure de la préparation de l'échantillon et de son analyse (Whitaker 2003). Les modalités de choix des items et de leur prélèvement sont présentées ci-dessous. Elles ne visent pas à une « représentativité » des échantillons prélevés par rapport à la contamination de la diète totale de chaque participant, mais plutôt à la caractérisation d'aliments « indicateurs » du niveau global de contamination des denrées couramment consommées et vecteurs d'OTA au sein du ménage enquêté.

## Identification de deux aliments-types par ménage

À partir des réponses apportées au questionnaire de fréquence et d'habitudes alimentaires, nous identifions les deux aliments traditionnels vecteurs d'OTA qui sont d'une part les plus souvent consommés par l'individu interrogé, et d'autre part habituellement stockés par le ménage dont il est issu. Un échantillon de chacun de ces deux aliments est prélevé pour analyse de l'OTA afin d'appréhender la contamination usuelle des denrées effectivement consommées par les participants de chaque ménage (« aliments-type »).

## Modalités des prélèvements

Le seul contrôle possible sur la représentativité de l'échantillon prélevé (matières premières habituellement utilisées par le sujet, mode de préparation usuel) repose ici sur une explication claire des enjeux de l'analyse aux participants.

Les échantillons sont prélevés par l'habitant sur aliment de base stocké par le ménage. Afin d'éviter les contaminations microbiennes, un ustensile jetable est fourni, l'échantillon est placé immédiatement dans un sachet à usage alimentaire et conservé à température ambiante. La quantité nécessaire à l'analyse d'OTA est de 50 à 100g (Bacha, communication personnelle).

### II.5.3 Prélèvements biologiques

#### Nature des prélèvements

Un prélèvement de type spot urinaire et un échantillon de sang veineux seront effectués sur chaque participant consentant. Les prélèvements biologiques seront effectués le même jour chez tous les sujets d'un même ménage.

Les échantillons d'urines peuvent être de quatre types (Landi and Caporaso 1997) : premières urines du matin, échantillon fractionné (deuxième miction du matin, après vidange de l'urine nocturne), spot aléatoire, ou échantillon prélevé sur une durée déterminée (généralement total des mictions sur 12 ou 24h, afin d'intégrer les variations circadiennes du métabolisme).

La collecte des urines de 24h est logistiquement lourde et très contraignante pour les participants. Elle n'est pas envisageable dans le cadre de notre étude et risquerait d'engendrer des biais de mesure importants en raison de collectes incomplètes ou incorrectes.

Cela pose question pour le dosage de l'OTA urinaire car la validation d'un spot urinaire n'a pas encore été effectuée. En revanche, les dosages urinaires relatifs aux marqueurs rénaux ne sont jamais réalisés sur les urines de 24h qui engendrent des biais évoqués plus haut (K/DOQI 2002). C'est l'urine de la première ou de la seconde miction du matin qui est généralement utilisée pour la protéinurie, la microalbuminurie et les autres marqueurs enzymatiques (Price 2004). Il existe en effet des variations physiologiques durant le nyctémère et les premières urines sont en principe plus concentrées. Un problème se pose cependant dans le cas du dosage de la  $\beta$ 2MG urinaire : sa sensibilité aux pH acides. Les premières urines du matin ont séjourné plusieurs heures dans la vessie. Pendant cette durée, la  $\beta$ 2MG a pu être dégradée.

Un spot des secondes urines du matin sera donc récolté. Les résultats seront rapportés à la créatinurie. Cette dernière peut être obtenue à partir d'un spot urinaire en calculant la clairance de la créatine à partir de la créatinémie (K/DOQI 2002).

Par ailleurs, 10 ml de sang veineux seront prélevés par la même selon les bonnes pratiques en vigueur.

## Importance des étapes, du prélèvement au stockage des échantillons

Les modalités de prélèvement, de conditionnement et de stockage des échantillons biologiques doivent permettre d'assurer la stabilité des analytes dans la matrice considérée, ce jusqu'à leur analyse.

### *(1) Prélèvement*

Des instructions claires doivent avoir été transmises par les personnels de recherche aux personnels de terrain et par ces derniers aux participants de l'étude (Holland and al. 2003). Elles concernent le type des prélèvements et leurs modalités (matériel, moment de la journée, position du sujet), les mesures à prendre pour assurer la stabilité des analytes à doser dans les matrices prélevées (ajout d'anti-coagulants, d'agents stabilisants, température et délai entre le prélèvement et sa préparation) ainsi que les consignes de sécurité. Des cas des instructions relatives à l'hygiène corporelle doivent être fournies pour éviter les contaminations externes. Il est parfois nécessaire de faire certaines recommandations aux participants concernant le comportement à adopter la veille des prélèvements, notamment limitation de l'activité physique. Les procédures relatives à l'étiquetage et à l'information des échantillons (fiche de prélèvement et de suivi) doivent également être standardisées (Landi and Caporaso 1997).

### *(2) Préparation*

Les échantillons doivent être dûment préparés pour assurer leur conservation. Ceci consiste la plupart du temps en la séparation des différents constituants : sérum par centrifugation après coagulation, plasma par sédimentation sur un gradient de Ficoll, fraction acellulaire des urines par centrifugation (surnageant) (Holland and al. 2003). Il est important de diviser l'échantillon total en plusieurs aliquots de volume suffisant pour chaque type d'analyse à réaliser, ce afin d'éviter les cycles de congélation-décongélation. Il faut également adapter les conditions de stockage en fonction des propriétés de l'analyte, par exemple par l'ajout de cryo-protecteurs ou de bactéricides, ces derniers étant toutefois déconseillés dans le cas des enzymes et protéines urinaires.

Les principaux facteurs affectant la stabilité des protéines et enzymes urinaires avant la préparation et durant la conservation sont le pH et la température.

#### *(a) Le pH*

La NAG (et en particulier l'iso-enzyme A) perd une partie de son activité à pH alcalin ( $\text{pH} \geq 8$ ) (Mattenheimer and Maruhn 1992; Morita and et al. 1998) ; la stabilité de la RBP diminue quand le pH diminue (Guy and McMurray 1993) et la  $\beta 2$ -microglobuline est labile à pH acide ( $\text{pH} \leq 6$ ). En particulier, elle est dégradée dans la vessie à pH 5,5 et il est rarement possible de compenser cet effet. Le pH des urines du matin varie généralement entre 5 et 6. Au vu des conditions de terrain et de la conservation par congélation, nous n'ajusterons pas le pH urinaire.

#### *(b) La température*

L'activité enzymatique de la NAG n'est stable que quelques heures dans un échantillon brut (sans additif) conservé à température ambiante. Conservé à  $+4^\circ\text{C}$ , l'échantillon reste stable jusqu'à 50 jours après le prélèvement, et en cas de stockage à  $-20^\circ\text{C}$  après ajout d'un additif cryo-protecteur (30% v/v glycérol ou éthylène glycol), la stabilité est assurée pendant un an (Mattenheimer and Maruhn 1992). Des remarques similaires peuvent être faites sur la faible stabilité des protéines urinaires conservées à température ambiante. Enfin, les cycles congélation-décongélation sont à éviter, en particulier pour la NAG. Nous nous assurerons

donc que les échantillons restent le moins longtemps possible à température ambiante avant leur conditionnement et leur stockage.

### *(3) Stockage*

La température optimale dépend de la durée du stockage prévue et de la stabilité des analytes dans la matrice testée (Holland and al. 2003). Il est courant de conserver le sérum à  $-70^{\circ}\text{C}$  et les urines à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Sur le terrain, nous ne disposons que d'un congélateur à  $-20^{\circ}\text{C}$ , température de stockage que nous adoptons.

## Réalisation pratique

### *(1) Urines*

Un spot des secondes urines du matin sera récolté à raison de 30 à 50ml dans un pot en polyvinyle remis au sujet par l'enquêteur, qui donne aux participants des instructions claires sur les modalités du prélèvement :

- Au lever, la personne émie dans les toilettes la totalité des urines de la nuit en faisant un effort maximum pour bien vider la vessie ;
- Au moment de la miction suivante (secondes urines du matin) :
  - Afin d'éviter les contaminations bactériennes, la personne se lave préalablement les mains et évite de toucher l'intérieur du flacon ;
  - L'homme se décalotte (dans le cas de la population tunisienne, la pratique de l'excision rend cette étape inutile) et la femme écarte les lèvres. La personne commence à uriner, puis sans cesser d'uriner, approche le flacon du jet, le remplit, et toujours sans cesser d'uriner, le retire du jet, ferme le flacon, se lave les mains et rince l'extérieur du récipient.

Lors du passage pour récolter les échantillons, l'enquêteur mesure immédiatement le pH (à l'aide d'une bandelette) et appose l'étiquette d'identification sur le flacon sec. Il dépose le prélèvement dans la glacière portative pour le maintenir à une température inférieure à  $10^{\circ}\text{C}$  après avoir effectué le test par bandelettes urinaires. Il renseigne alors les informations de la fiche-type de prélèvement et de suivi. Les informations portent notamment sur la date et l'heure de la miction d'où provient le prélèvement pour les urines, l'heure du recueil du prélèvement par l'enquêteur (urines et sang), le pH du prélèvement (pour l'urine), l'état de santé de la personne (présent), le type et l'heure de la dernière prise alimentaire, le délai depuis la dernière prise de médicaments (Mattenheimer and Maruhn 1992), le délai depuis la dernière prise de tabac et d'alcool, le délai depuis les dernières menstruations.

Les échantillons urinaires déposés dans la glacière arriveront au local de l'étude dans les deux heures suivant leur collecte. Ils seront alors immédiatement conditionnés (5 aliquots de 5ml) et congelés à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Pour chaque région, lors de la clôture de la vague d'enquête, les échantillons congelés seront rapatriés par transport frigorifique jusqu'au laboratoire d'analyses de la Faculté de Monastir (LRSBC : Laboratoire de Recherche sur les Substances Biologiquement Compatibles, Faculté du Centre, Monastir, Tunisie) où ils seront de nouveaux stockés à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'à leur analyse effective. Tous les échantillons d'urines seront analysés dans le même laboratoire. Un contrôle qualité sera effectué depuis la collecte jusqu'à l'analyse des échantillons (Holland and al. 2003; Landi and Caporaso 1997).

### *(2) Sang*

Le prélèvement de sang, destiné au dosage de l'OTA et de la créatinine sérique, ne nécessite pas d'être fait à jeun. Un échantillon de 10 ml de sang veineux est prélevé (tubes pré-

étiquetés, sans additif) par un infirmier-enquêteur selon les bonnes pratiques en vigueur lors du recueil des urines (annexe 5). Les prélèvements sont laissés à température ambiante jusqu'à formation complète du caillot. Les échantillons coagulés sont alors transportés au local de conditionnement et de stockage et centrifugés (centrifugation douce). Le sérum ainsi récolté (surnageant) est aliquoté en deux tubes de 5ml pré-étiquetés puis congelé à -20°C (Holland and al. 2003; Landi and Caporaso 1997).

## II.6 Analyses biologiques et toxicologiques

Le tableau 8 présente les analyses biochimiques et toxicologiques qui seront effectuées sur les urines et le sérum.

Matrice	Paramètre	Méthode
Urines	OTA	HPLC
	pH	papier pH
	dépistage <sup>a</sup>	bandelettes
	créatinine	Jaffé
	NAG	colorimétrie
Sérum	RBP, $\beta$ 2M, $\mu$ ALB	ELISA
	OTA	HPLC
	créatinine	Jaffé

a: protéines totales, hématies, leucocytes, sédiments urinaires, glucose

**Tableau 8** : Analyses biochimiques et toxicologiques des échantillons de sérum et d'urine.

### II.6.1 Dosage de l'OTA dans le sérum, les urines et les aliments

Le laboratoire de biochimie de la Faculté de Médecine Dentaire de Monastir (LRSBC) a mis au point une méthode de dosage de l'OTA dans le sérum et dans les aliments (Bacha et al. 1993; Maaroufi et al. 1995a) qui n'a pas encore fait l'objet d'une validation complète et n'a pas été testée sur les urines. Elle repose sur les étapes suivantes (tableau 9) :

<b>Extraction Purification</b>	Extraction en phase solide - cartouches <sup>18</sup> C (lavage à l'acide acétique, élution au méthanol à pH acide)
<b>Détection</b>	Séparation par chromatographie liquide haute performance (CLHP) Détection par spectro-fluorométrie
<b>Confirmation</b>	Hydrolyse de l'OTA en ochratoxine $\alpha$ par la carbopeptidase Estérification <sup>a</sup> au BF <sub>3</sub>

a: Le méthyl-ester d'OTA a un temps de rétention à peu près double de celui de l'OTA sur le chromatographe HPLC

**Tableau 9** : Principe général de la méthode de dosage de l'OTA dans le sérum au LRSBC.

Dans ces conditions, la limite de détection (LOD) est de 0,1ng/ml, la limite de quantification (LOQ) est de 0,5ng/ml (Maaroufi et al. 1999). La LOD obtenue pour le sérum semble élevée au regard des concentrations moyennes d'OTA retrouvées dans les urines en population humaine (de moins de 0.01 ng/ml à 0.058 ng/ml, voir tableau 5b). Le dosage de l'OTA dans

les urines nécessite une méthode très sensible. La phase d'extraction-purification a à ce titre une influence décisive sur la récupération de l'analyte. Or un laboratoire de l'ITEM (Istituto Tossine e Micotossine da Parassiti Vegetali, Consiglio Nazionale delle Ricerche CNR, Bari, Italie) a validé, dans les urines, une méthode utilisant des colonnes d'immuno-affinité pour améliorer les performances de cette étape (Pascale and Visconti 2001). Cette méthode est très sensible, puisqu'elle présente une LOQ de 0.001 ng/ml ; de plus, le taux de récupération s'élève à 90.2% [88.4-93.2%], et la répétabilité est bonne avec un CV moyen de 3.9% [1.1-8.2%] pour une gamme de calibration de 0.05 à 1 ng/ml. Dans l'attente d'un essai inter-laboratoires entre le LRSBC et l'ITEM, les analyses d'OTA sont confiées à ce dernier.

## II.6.2 Utilisation de bandelettes urinaires

### Principe du dépistage par bandelettes réactives

Les bandelettes urinaires s'inscrivent dans le cadre des examens permettant le dépistage à grande échelle d'une atteinte rénale en raison de leur sensibilité, de leur simplicité, et de leur coût relativement modeste (Hannedouche 1999). Les bandelettes sont polyvalentes et permettent d'évaluer simultanément plusieurs paramètres. L'examen est réalisé sur l'urine fraîche homogénéisée au domicile du participant tout de suite après récolte par l'enquêteur, avec lecture visuelle par rapprochement avec l'échelle colorimétrique.

### Plages réactives

Le test de dépistage des **protéines** est basé sur le principe de l'erreur protéique des indicateurs de pH. Le test est particulièrement sensible à l'albumine. La détection du **glucose** repose sur la réaction glucose oxydase-peroxydase avec une limite de détection pratique de 0,4g/l (soit 2,2mmol/l). Pour les **leucocytes**, le test met en évidence l'activité des estérases granulocytaires qui donne dans la zone réactive une couleur violette. Le test permet de détecter les leucocytes lysés et intacts. L'hémoglobine et la myoglobine catalysent l'oxydation de l'indicateur de sang (**hématurie**) par l'hydroperoxyde organique contenu dans la zone réactive.

### Validité

L'examen par bandelettes multiréactives est un moyen commode de dépister les principales anomalies cytologiques ou biochimiques de la composition de l'urine.

Un examen pratiqué dans des conditions rigoureuses et qui se révèle totalement négatif permet d'exclure raisonnablement une protéinurie significative, une hématurie ou une leucocyturie et permet de ne pas prescrire d'examen cyto bactériologiques urinaires en l'absence de contexte clinique évocateur (Hannedouche 1999).

Inversement toute anomalie de l'examen par les bandelettes impose une confirmation et des précisions par des examens biologiques appropriés obligatoirement réalisés au laboratoire.

## II.6.3 Dosage de la créatinine sérique et urinaire

Le dosage de la créatinine est effectué selon la méthode de Jaffé modifiée (Bartels and Bohmer 1971; Jaffé 1886). En solution alcaline, la créatinine forme avec l'acide picrique un composé de couleur jaune orangé dont l'intensité est proportionnelle à la concentration de créatinine. Cette concentration est déterminée par rapport à un étalon de concentration connue.

#### II.6.4 Estimation du débit de filtration glomérulaire (DFG)

Le débit de filtration glomérulaire (DFG) est couramment reconnu comme la meilleure mesure globale de la fonction rénale. C'est sur ce paramètre que repose la classification des différents stades (gravité) de la pathologie rénale chronique. Le DFG est généralement estimé à partir de la clairance de la créatinine. La clairance correspond au coefficient d'épuration plasmatique, c'est-à-dire le volume de plasma exprimé en millilitre que le rein est capable d'épurer en une minute de la substance étudiée. La formule générale de la clairance est :

$$C = \frac{U \times V}{P}$$

où : C : clairance exprimée en ml/minute  
U : concentration urinaire de la substance en mg/ml  
P : concentration plasmatique de la substance en mg/ml  
V : volume d'urine émise en ml/minute

Cette formule nécessite toutefois de connaître le débit urinaire (V), ce qui implique d'avoir recueilli la totalité des urines sur une durée déterminée, généralement 12 ou 24h. Ce n'est ici pas notre cas puisque nous prélevons un spot des secondes urines du matin. Nous utilisons donc la formule de Cockcroft et Gault (Cockcroft and Gault 1976) qui permet d'estimer la clairance à partir de la seule créatininémie ( $S_{Cr}$  en mg/dl), de l'âge (en années) et du poids corporel (en kg), ce en fonction du genre :

$$Cl_{Cr} = \frac{[(140 - \text{âge}) \times \text{poids}]}{72 \times S_{Cr}} \times K \quad (\text{ml/min.})$$

où :  $K_{\text{homme}}=1$  et  $K_{\text{femme}}=0.85$ .

Plus récemment, une nouvelle équation a été proposée et validée dans un large échantillon de l'étude MDRD (Modification of Diet in Renal Disease) par (Levey et al. 1999). Cette équation repose sur le dosage de la créatinine sérique ( $S_{Cr}$  en mg/dl), l'âge (en années), le genre et l'origine ethnique :

$$GFR = \exp(5.228 - 1.154 \times \ln(S_{Cr}) - 0.203 \times \ln(\text{âge}) - a + b) \quad (\text{ml/min./1.73m}^2)$$

où :  $a=0.299$  chez la femme, 0 sinon ;  $b=0.192$  chez les noirs-américains, 0 sinon.

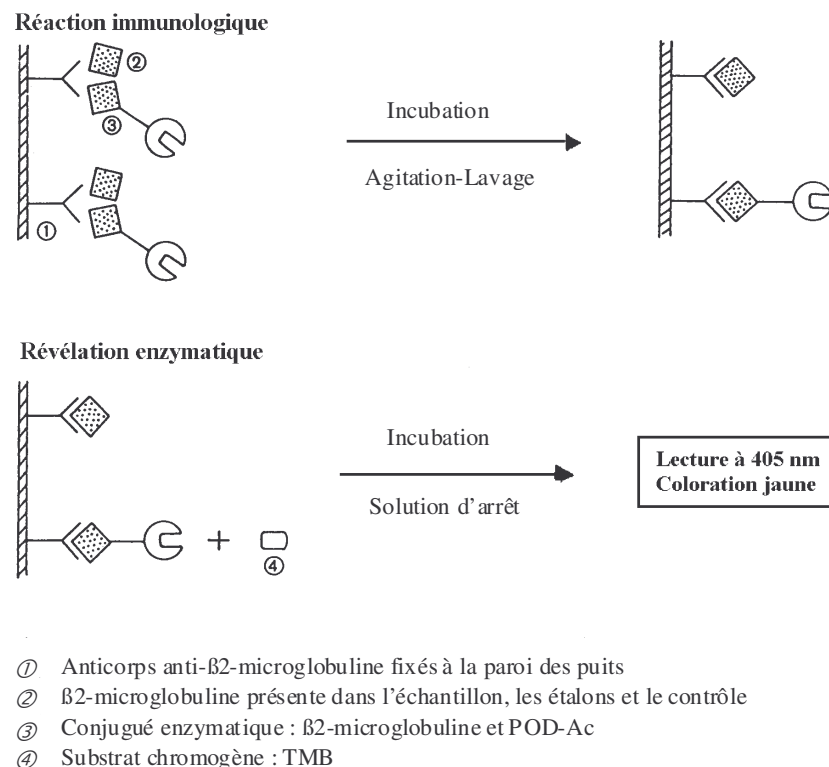
L'équation de l'étude MDRD semble allier une meilleure précision et un moindre biais dans l'estimation du débit de filtration glomérulaire rapporté à la surface corporelle. Le DFG est en général  $\geq 90$  ml/min/1.73m<sup>2</sup> chez un individu dont la fonction rénale n'est pas altérée (K/DOQI 2002). Toutefois, les seuils varient en fonction de l'âge et du genre (K/DOQI 2002).

## II.6.5 Dosage des indicateurs de toxicité rénale

### Dosage de la $\beta$ 2- microglobuline, la RBP et l'albumine urinaires

La  $\beta$ 2-microglobuline, la RBP et l'albumine sont dosés une méthode immuno-enzymatique de type compétition (ELISA). Nous présentons ici le principe de la méthode avec l'exemple de la  $\beta$ 2-microglobuline.

Les échantillons ou les standards sont incubés dans des puits d'une plaque de microtitration recouverts d'anticorps polyclonaux anti-  $\beta$ 2-microglobuline présents en excès. Après une étape de lavage afin d'éliminer les substances non retenues par les anticorps, la quantification de la  $\beta$ 2-microglobuline liée se fait à l'aide d'un anticorps anti-peroxydase (POD-Ac) qui se lie également à la  $\beta$ 2-microglobuline. Après incubation, le contenu des puits est éliminé par aspiration et les puits sont rincés pour éliminer l'excès du traceur. L'activité enzymatique liée est mesurée par addition de substrat chromogène (tetraméthylbenzidine TMB) (Figure 3). L'intensité de la coloration développée est appréciée à 450 ou 405 nm au moyen d'un lecteur de plaques ELISA. Elle est inversement proportionnelle à la concentration de la  $\beta$ 2-microglobuline présente dans l'échantillon, laquelle est appréciée par rapport à une courbe d'étalonnage réalisée avec des standards  $\beta$ 2-microglobuline fournis dans le coffret.



**Figure 3 :** Dosage de la  $\beta$ 2-microglobuline urinaire par méthode immuno-enzymatique.

## Dosage de la NAG urinaire

Le dosage de la NAG est par dosage colorimétrique fondé sur l'hydrolyse du substrat de la NAG. En présence de sels tampons, le composé phénolique issu de cette hydrolyse colore la solution de réaction en rouge, produisant une densité optique ( $\lambda=505$  nm ; spectrophotomètre Thermospectronic Helios  $\epsilon$ ) proportionnelle à l'activité de la NAG (Yuen et al. 1984; Yuen et al. 1982).

## Ajustement des résultats sur la créatine urinaire

La concentration protéique des urines étant affectée par le volume urinaire et par le taux d'excrétion protéique, la créatininurie est déterminée afin d'obtenir une estimation de la concentration/dilution des urines. La créatininurie peut être obtenue à partir d'un spot urinaire (K/DOQI 2002). Les résultats des analyses biochimiques (microALB, NAG, RBP et  $\beta$ 2MG) sont exprimés en  $\mu$ g/g créatinine ou UI/g créatinine (K/DOQI 2002; Newman et al. 2000).

## II.7 Principes généraux de l'analyse statistique

Les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du logiciel SAS.

Des statistiques descriptives sont produites sur l'ensemble de l'échantillon et pour chaque groupe d'exposition, ce pour chaque vague d'enquête. La variabilité de l'exposition entre les trois régions d'étude est évaluée par analyse de variance. La relation entre le niveau d'exposition à l'OTA et les paramètres de la fonction rénale est modélisée par régression linéaire multiple avec ajustement sur les facteurs de confusion identifiés. L'étude de la variabilité saisonnière (intra-individuelle) et de l'effet « ménage » s'appuie sur une modélisation mixte (modèles linéaires à effets aléatoires).

## III REALISATION PRATIQUE DE L'ETUDE

### III.1 Déroulement de l'étude

#### III.1.1 Durée de l'enquête terrain

Nous prévoyons de passer deux semaines complètes dans chaque zone d'étude en réalisant l'enquête successivement dans les trois zones, ce qui implique, en comptant trois jours de transition entre chaque zone (rapatriement des échantillons, transport du matériel et installation dans la nouvelle zone, formation du personnel local), que chacune des deux vagues d'enquête terrain durera en tout environ 50 jours.

#### III.1.2 Formation des personnels

Une journée de formation des personnels est organisée dans chaque zone d'étude les jours précédant le début du terrain. Les procédures écrites et standardisées de recueil des informations et des échantillons sont communiquées aux enquêteurs. Les aspects logistiques sont abordés de manière extensive.

#### III.1.3 Non-répondants et refus de participation

Les non-répondants (personnes absentes de leur domicile lors du premier passage de l'enquêteur) sont visités une seconde fois. En cas de refus de participation, un questionnaire minimal est posé aux personnes afin de pouvoir comparer les caractéristiques générales des non-répondants et des participants de l'étude et d'identifier d'éventuels biais de sélection.

### III.2 Prise en charge et retour d'information aux participants

#### III.2.1 Information et consentement des personnes se prêtant à la recherche

Le protocole de recherche OTARI a été approuvé par le Ministère tunisien de la Santé Publique, Direction de la Recherche Médicale.

L'information des personnes susceptibles de se prêter à la recherche est prévue comme suit. Lors du premier passage dans les ménages tirés au sort, les objectifs et modalités de l'enquête sont présentés aux participants, leur consentement est recueilli, et un questionnaire d'inclusion est passé par un enquêteur. Au cas où la personne remplit les critères d'éligibilité et consent à participer, l'enquêteur prend immédiatement RDV pour le lendemain ou le surlendemain afin de réaliser la collecte des urines, de l'échantillon de sang et la passation des autres questionnaires. Les modalités de cette collecte d'informations et d'échantillons biologiques sont expliquées par l'enquêteur aux personnes concernées.

L'anonymat des données individuelles lors de leur numérisation pour leur traitement est assuré par l'attribution d'un identifiant unique à chaque sujet inclus dans l'étude.

#### III.2.2 Prise en charge des personnes se prêtant à la recherche

En cas de résultat anormal lors des tests diagnostics réalisés (protéinurie, sédiments urinaires, leucocyturie, hématurie et créatininémie mais aussi HTA), le participant est convoqué pour un examen à l'hôpital le plus proche de son domicile ou à une consultation externe de néphrologie mise en place dans le CSB de la commune pour recevoir toutes les personnes concernées.

### III.3 Contrôle qualité

Des mesures de contrôle qualité sont mises en place aussi bien pour le recueil, le transport et le stockage des échantillons biologiques (Holland and al. 2003; Landi and Caporaso 1997) que pour leur analyse, la passation des questionnaires et leur saisie informatique (saisie contrôlée et double-saisie d'un sous-échantillon de questionnaires). En particulier, 10% des échantillons d'urine, de sérum et d'aliments sont envoyés à l'ITEM à des fins de contrôle qualité analytique.

### III.4 Communication et diffusion des résultats de l'étude

Les partenaires institutionnels, scientifiques et financiers recevront un rapport des résultats de l'enquête. Une réunion d'information sera également organisée dans chaque zone d'étude pour présenter aux participants les principaux résultats de la recherche à laquelle ils se seront prêtés. Les résultats de la recherche seront soumis à publication par les investigateurs principaux pour diffusion dans la communauté scientifique internationale.

### III.5 Liste des partenaires scientifiques, techniques et financiers

#### Investigateurs principaux

ACHOUR Abdellatif (CHU Monastir et Université du Centre, Tunisie – MD)

BACHA Hassen (Université du Centre, Tunisie – MSc, PhD)

COUNIL Emilie (INRA, France – MSc, Doctorante)

VERGER Philippe (INRA, France – MD, PhD)

#### Conseil scientifique et technique

CLAVEL Françoise (INSERM, France – MD, PhD)  
CORDIER Sylvaine (INSERM, France – MD, PhD)  
CREPPY Edmond (Université Bordeaux II, France – MSc, PhD)  
SOLFRIZZO Michele (CNR, Italie – MSc, PhD)  
STENGEL Bénédicte (INSERM, France – MD, PhD)  
VOLATIER Jean-Luc (AFSSA, France – MSc)

#### Partenaires terrain

SINACEUR Mustapha (FAO, Tunisie)  
INS (base de sondage)  
Services municipaux (listes électorales et facilitateurs sur le terrain dans chaque commune)  
Hôpital régional : Bou Salem  
Hôpitaux de circonscription : Jelma et Nefta  
Directions régionales de la Santé Publique  
Centre Hospitalo-Universitaire Fatouma Bourguiba de Monastir  
ITEM : Istituto Tossine e Micotossine da Parassiti Vegetali (CNR, Bari, Italie)

#### Partenaires financiers

INRA (France)  
Secrétariat d'Etat de la Recherche Scientifique et de la Technologie (République Tunisienne)  
Université du Centre (République Tunisienne)

# OTARI : ÉTUDE PILOTE DE FAISABILITE

## I INTRODUCTION ET OBJECTIFS

La conduite d'une étude préalable de faisabilité est indispensable au bon déroulement d'un protocole tel qu'OTARI et à la validité des résultats. Nous présentons ici les objectifs, de l'étude pilote, notamment aux tableaux 1 et 2.

Objectif général	Objectif spécifique	
	Indicateurs d'exposition	Indicateurs d'effets
Variabilité inter-individuelle	Distribution des niveaux d'exposition dans la population d'étude	Distribution des concentrations de protéines et enzymes urinaires dans la population d'étude
Facteurs de variation	Effet de l'âge, du genre, de l'indice de masse corporelle	Effet de l'âge, du tabac, de l'alcool, des médicaments néphrotoxiques, de l'indice de masse corporelle, de la tension artérielle, du pH urinaire
Faisabilité	Acceptabilité et logistique des prélèvements : seconde miction et sang total	

**Tableau 1** : Objectifs de caractérisation des indicateurs d'exposition et d'effets.

Type de questionnaire	Objectif de caractérisation
Inclusion et médical Socioprofessionnel et habitudes de vie Fréquence et habitudes alimentaires	Intelligibilité des questions Temps de passation des questionnaires Acceptabilité des questions
Fréquence et habitudes alimentaires	Cohérence et praticité de l'organisation des questions Faisabilité de la saisie et du traitement des données Élaboration et test d'une méthode de calcul du score d'exposition à l'OTA

**Tableau 2** : Objectifs relatifs au recueil des informations individuelles.

L'acceptabilité de la récolte d'aliments familiaux doit être évaluée auprès des participants. Les modalités pratiques doivent être testées, notamment : le lien entre les résultats du questionnaire de fréquence et d'habitudes alimentaires et le choix des deux items à prélever par l'enquêteur, les matériels et procédures de prélèvement, les quantités, le conditionnement, l'étiquetage et le stockage des échantillons.

L'acceptabilité globale de l'étude et les motifs de refus doivent être caractérisés dans l'échantillon de l'étude pilote afin de minimiser la proportion de refus dans l'étude principale.

D'un point de vue bio-analytique, l'objectif principal est de réaliser un essai inter-laboratoire des performances de la méthode utilisée à Monastir (méthode 1) comparativement à une méthode préalablement validée (méthode 2, (Pascale and Visconti 2001)).

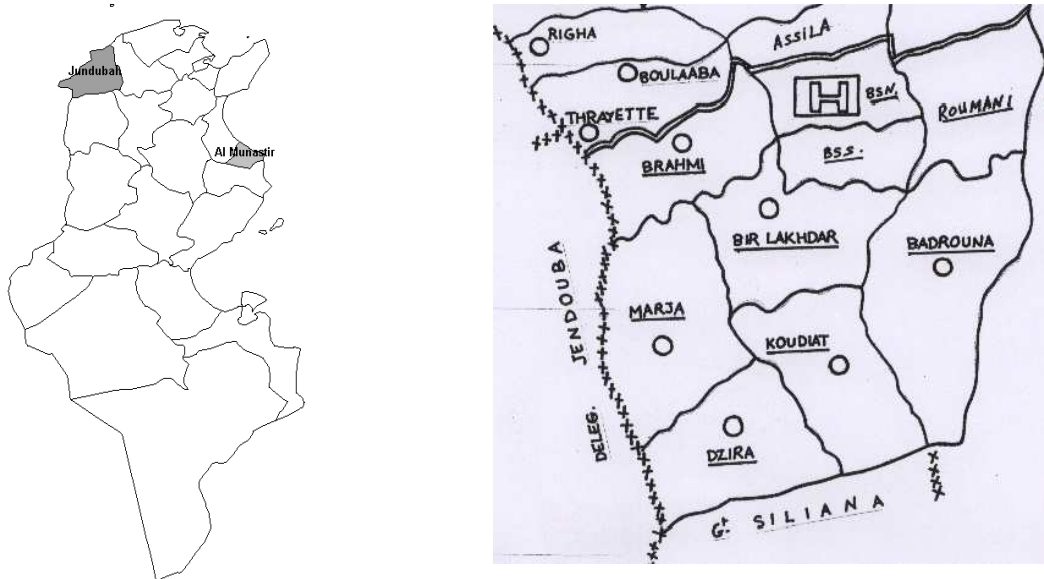
Le pilote est enfin l'occasion de tester le déroulement général de l'étude (nombre, moments et ordre des visites), l'adéquation des locaux, matériels et personnels, la qualité de la formation des personnels, les modalités et le contenu de l'information des participants, le respect de la chaîne du froid, et l'implémentation du contrôle qualité.

## II MATERIELS ET METHODES

### II.1 Constitution de l'échantillon d'étude

#### II.1.1 Choix de la zone d'étude

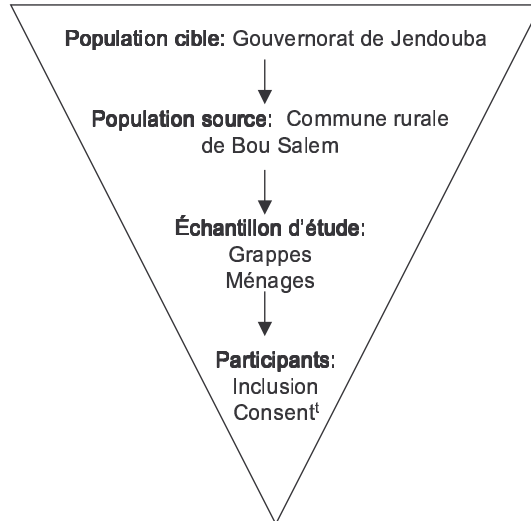
Le gouvernorat de Jendouba au nord-ouest du pays est, parmi les trois choisis pour l'étude OTARI, celui où les conditions agro-géo-climatiques seraient les plus favorables à l'apparition de niveaux élevés de contamination des denrées alimentaires et d'exposition de la population. Afin de pré-tester cette hypothèse, nous choisissons de réaliser l'étude pilote sur un échantillon de la population de la commune rurale de Bou Salem, dans le gouvernorat de Jendouba (voir figure 1).



**Figure 1** : Carte de la Tunisie situant le gouvernorat de Jendouba. Carte simplifiée de la délégation de Bou Salem et de ses localités.

#### II.1.2 Principe de constitution et taille de l'échantillon

Deux unités statistiques nous intéressent : la famille (le ménage) et l'individu (cf. protocole principal). Le recrutement des ménages est laissé aux soins d'un acteur local de santé. La représentativité n'est pas critique dans cette phase pilote. Toutefois, on veille à assurer une certaine diversité géographique des ménages au sein des 9 localités de la délégation. Les critères d'inclusion et de non inclusion de l'étude OTARI sont appliqués aux sujets de l'étude pilote (cf. p12). La figure 2 illustre la séquence de constitution de l'échantillon.



**Figure 2 :** De la population cible aux participants de l'étude pilote.

Il n'existe pas, dans le cadre d'une étude de faisabilité, de critères standardisés pour calculer la taille du groupe à enquêter. Il semble cependant, après consultation de personnes compétentes (Falissard 2004, communication personnelle), que l'inclusion de 50 à 60 personnes soit ici raisonnable.

## II.2 Réalisation pratique de l'étude

### II.2.1 Description des locaux, personnels et équipements

#### Locaux

Le directeur de l'hôpital régional de Bou Salem a mis à notre disposition une salle de réunion ainsi qu'un espace de travail dans le laboratoire de biochimie de l'hôpital pour la préparation, le conditionnement et le stockage des échantillons alimentaires et biologiques pendant la durée du pilote. Après leur rapatriement, les échantillons ont été stockés au LRSCB de Monastir.

#### Personnels

Le personnel suivant a été affecté à l'étude pilote :

- Personnels de l'hôpital régional de Bou Salem
  - Une infirmière (enquêteuse)
  - Un surveillant (point de contact avec la population)
  - Un ambulancier (chauffeur)
  - Une laborantine (appui à la préparation et au conditionnement des échantillons)
- Personnels des équipes de recherche impliquées
  - Deux chercheurs en biochimie (LRSCB de Monastir et ITEM de Bari)
  - Une doctorante en épidémiologie
  - Une technicienne de laboratoire
- Personnels recrutés pour l'étude pilote
  - Deux médecins (enquêteurs)
  - Un infirmier (enquêteur)

## Equipements

Sur le terrain, les équipements suivants ont été mobilisés :

- Deux véhicules : un véhicule tout terrain pour le déplacement quotidien des enquêteurs chez les ménages, une voiture particulière pour le rapatriement des échantillons biologiques vers le LRSBC à la fin du terrain ;
- Des glacières pour le recueil et le transport des échantillons biologiques ;
- Un congélateur à  $-20^{\circ}\text{C}$  pour le stockage des échantillons biologiques ;
- Une centrifugeuse réfrigérée pour la préparation des échantillons de sérum.

### II.2.2 Formation des personnels et suivi du terrain

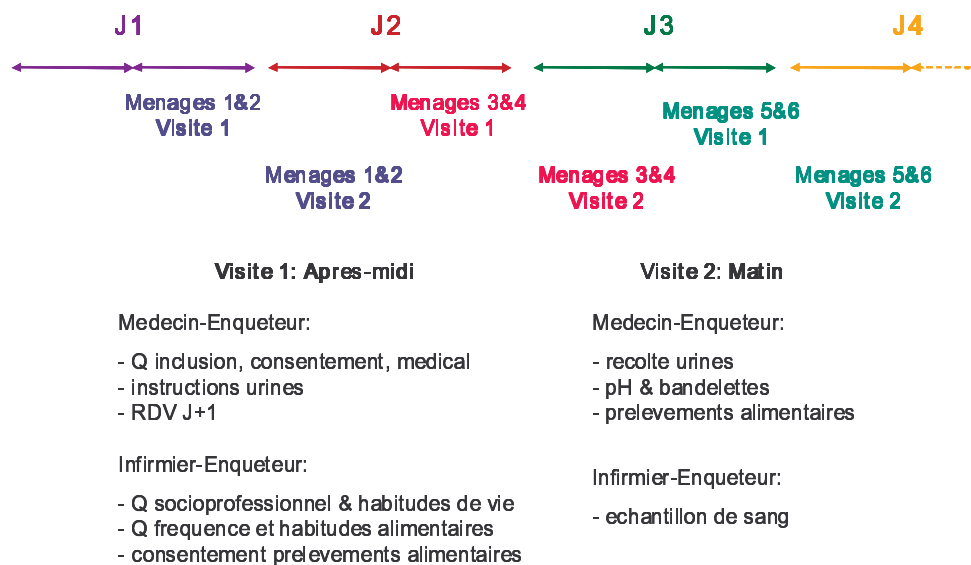
Une journée de formation des personnels a été organisée la veille du début du terrain. Les procédures écrites et standardisées de recueil des informations et des échantillons ont été communiquées aux enquêteurs (voir annexe 5). Les aspects logistiques ont été abordés de manière extensive. Chaque matin de la phase de terrain, une réunion de staff s'est tenue avec toute l'équipe pour la distribution du planning et du matériel de la journée. Le soir, chaque enquêteur a fait le bilan des problèmes rencontrés, ce afin de suivre l'avancement et le bon déroulement de l'inclusion des sujets.

### II.2.3 Modalités de recrutement des participants

Le surveillant de l'hôpital a fait un travail préalable d'identification et de contact des ménages sur l'ensemble de la délégation de Bou Salem, avec le souci de recruter des personnes dans les différentes localités (au nombre de 9 dans un rayon de 30 km autour de l'hôpital). Grâce à cette visite préalable d'information de recueil de leur consentement, et de prise de RDV, aucun refus de participation n'a été rencontré.

### II.2.4 Organisation des visites et gestion des échantillons

La figure 3 présente le diagramme de déroulement des visites et de recueil des informations individuelles, spécimens biologiques et échantillons alimentaires. À titre d'exemple, nous présentons le planning de travail d'une équipe de deux enquêteurs (un médecin, un(e) infirmier(e)) sur la base de l'inclusion moyenne de deux ménages par jour. Chaque ménage a été visité deux fois : lors de la première visite, généralement l'après-midi, les enquêteurs ont procédé à l'inclusion des personnes consentantes, au recueil des informations individuelles, et à l'explication des modalités de réalisation des prélèvements biologiques. La seconde visite, relative aux prélèvements urinaires, sanguins et alimentaires, a généralement eu lieu le lendemain, et impérativement le matin afin que les urines de la seconde miction ne séjournent pas plus de deux heures à température ambiante. Les questionnaires ont été élaborés en français (voir le protocole principal) puis traduits en arabe pour être passés oralement aux sujets de l'étude par un enquêteur dûment formé. Les échantillons ont été prélevés (sang) et recueillis (urines) puis préparés, conditionnés et stockés au laboratoire de biochimie de l'hôpital de Bou Salem tel que décrit dans le protocole principal. Leur rapatriement vers le LRSBC de Monastir a été effectué par la route. Les échantillons ont été déposés dans des glacières le temps du trajet (environ 250 km), puis recongelés à  $-20^{\circ}\text{C}$  au LRSBC jusqu'à leur analyse. Les échantillons alimentaires ayant été réalisés sur produits bruts (« secs »), aucun conditionnement particulier n'a été nécessaire à leur stockage et leur transport.



**Figure 3** : Déroulement des visites réalisées par une équipe de deux enquêteurs.

## II.3 Aspects analytiques

### II.3.1 Protéinurie et enzymurie

Le détail des tests et analyses relatives à la fonction rénale et la détection de manifestations néphrotoxiques précoces réalisés sur les urines et le sérum est présenté dans le protocole principal. Nous présentons uniquement ici les matériels utilisés.

La détection d'une protéinurie, d'une glucosurie ou de signes biologiques d'infection urinaire a été réalisée par bandelettes réactives de type Combur-Test® (Roche Diagnostics) sur les urines fraîches au domicile du participant.

La  $\beta$ 2-microglobuline, la RBP et l'albumine ont été dosées au LRSBC au moyen de coffrets ImmunoDiagnostik (Références K6210 ; K6110 ; K6330). Les microplaques ELISA ont été lues dans un lecteur Biotek® ELX 800 Universal Microplate Reader. Le dosage de la NAG a été réalisé au LRSBC au moyen d'un coffret PPR Diagnostics Ltd et d'un spectrophotomètre Thermospectronic Helios  $\epsilon$ . La créatinine a été déterminée par la réaction avec l'acide picrique (BioLabo S.A.) au moyen d'un automate Bayer/Technicon™ Ra Xt au Service de Biochimie du CHU Habib Bourguiba de Sfax. Les analyses ont été réalisées sur les urines et le sérum moins de deux semaines après leur collecte et stockage à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### II.3.2 Dosage de l'OTA

La méthode utilisée par le laboratoire de Monastir a été décrite dans le protocole principal. Ce descriptif est cependant obsolète car le laboratoire de Monastir est en train de réviser ses méthodes avec le laboratoire de Bari (ITEM) et le Ministère tunisien de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche Scientifique et de la Technologie, ce afin d'en améliorer les performances, notamment en terme de limites de détection.

#### Essai inter-laboratoires

Afin de valider la méthode de dosage de l'OTA dans les urines initialement développée au



saisie contrôlée des données), puis exportées vers le logiciel SAS© (version 8.02 pour Windows) pour leur traitement statistique. L'anonymat des données traitées a été assuré par l'attribution d'un identifiant unique à chaque sujet inclus.

#### II.4.2 Construction d'un score d'exposition

Disposant d'une part de données de fréquence de consommation alimentaire sans tailles de portion, et d'autre part de seulement un à deux prélèvements de céréales par ménage, nous avons construit deux types de scores destinés à classer les individus selon leurs niveaux relatifs d'exposition alimentaire à l'OTA :

- 1 Un score « céréales »  $Z_i^{céréales}$  construit en faisant le produit, pour chaque individu de l'échantillon, de la somme des fréquences de consommation de chacun des items regroupés dans la catégorie « féculents » et « pains » par la contamination moyenne des céréales prélevées dans le ménage auquel est rattaché l'individu :

$$Z_i^{céréales} = \left( \sum_{p=1}^P F_{ip} \right) \cdot C_{j_i}$$

- où
- i est l'indice individu :  $i \in (1, 2, \dots, 59)$
  - p est l'indice aliment (P est le nombre d'aliments dans les groupes « féculents » et « pains »)
  - $j_i$  est l'indice du ménage auquel est rattaché l'individu  $j_i : i \in (1, 2, \dots, 23)$
  - $F_{ip}$  est la fréquence de consommation de l'aliment p déclarée par l'individu i :  $F_{ip} \in (1, 2, \dots, 59)$
  - $C_{j_i}$  est la contamination observée dans le(s) prélèvement(s) de céréales du ménage  $j_i$

- 2 Un score « pondéré »  $Z_i^{pondéré}$  construit en faisant le produit, pour chaque individu de l'échantillon, de la somme des fréquences de consommation de chacun des items regroupés dans les catégories « féculents » et « pains », « café », « viande » et « fruits secs » par la contribution moyenne supposée de chacun des groupes d'aliments à l'exposition totale à l'OTA :

$$Z_i^{pondéré} = \sum_{g=1}^G \left( \sum_{p=1}^{P_g} F_{ip} \right) \cdot K_g$$

- où
- i est l'indice individu :  $i \in (1, 2, \dots, 59)$
  - p est l'indice aliment ( $P_g$  est le nombre d'aliments dans le groupe g et  $G=4$ )
  - $F_{ip}$  est la fréquence de consommation de l'aliment p déclarée par l'individu i :  $F_{ip} \in (1, 2, \dots, 59)$
  - $K_g$  est la contribution supposée du groupe d'aliments g à l'exposition totale à l'OTA

Les contributions relatives  $K_g$  ont été déterminées à partir des données de la coopération scientifique européenne réalisée en 2002 sur les vecteurs alimentaires d'exposition à l'OTA (Miraglia and Brera 2002). Les estimations nationales faites pour 12 pays de l'Union sont rapportées au tableau 3.

Nous avons choisi de nous baser majoritairement sur les contributions relatives déterminées dans les pays du Sud de l'Europe (Espagne, Portugal, Grèce), à l'exception de l'Italie pour laquelle le profil d'exposition est très largement dominé par la consommation de vin. Les contributions retenues pour notre échantillon de la population tunisienne sont : 75% pour le groupe céréales, 14% pour les fruits secs, 10% pour le café, et 1% pour la viande, tenant compte du mode de vie rural et des habitudes alimentaires locales.

Pays	Céréales	Café	Bière	Vin	Cacao	Fruits secs	Viande	Épices	Autres
Allemagne	56,0%	12,1%	6,9%	4,3%	6,0%	4,3%	5,2%	1,7%	3,4%
Danemark	48,6%	10,7%	7,9%	6,2%	5,1%	10,2%	4,0%	1,1%	6,2%
<b>Espagne</b>	<b>61,2%</b>	<b>10,8%</b>	<b>6,5%</b>	<b>5,0%</b>	<b>7,9%</b>	<b>0,0%</b>	<b>0,7%</b>	<b>7,9%</b>	<b>0,0%</b>
Finlande	28,1%	11,5%	3,3%	3,3%	3,0%	0,5%	2,2%	0,5%	47,5%
France	43,0%	9,4%	7,9%	17,7%	4,2%	3,8%	0,0%	0,8%	13,2%
Grande-Bretagne	17,1%	2,7%	18,7%	2,7%	2,7%	3,2%	12,3%	1,1%	34,2%
<b>Grèce</b>	<b>72,0%</b>	<b>7,6%</b>	<b>2,3%</b>	<b>3,8%</b>	<b>6,8%</b>	<b>0,0%</b>	<b>0,8%</b>	<b>6,8%</b>	<b>0,0%</b>
Italie	4,9%	4,9%	0,8%	70,5%	7,4%	0,0%	0,8%	9,8%	0,8%
Norvège	46,0%	9,9%	10,6%	6,8%	5,6%	11,2%	4,3%	1,2%	4,3%
Pays-Bas	52,9%	9,5%	7,4%	3,3%	2,1%	7,4%	2,9%	2,9%	11,6%
<b>Portugal</b>	<b>59,5%</b>	<b>7,8%</b>	<b>0,9%</b>	<b>1,7%</b>	<b>8,6%</b>	<b>15,5%</b>	<b>0,9%</b>	<b>5,2%</b>	<b>0,0%</b>
Suède	65,6%	1,9%	5,6%	11,3%	5,6%	0,0%	4,4%	1,3%	4,4%
<b>Ensemble</b>	<b>46,2%</b>	<b>8,2%</b>	<b>6,6%</b>	<b>11,4%</b>	<b>5,4%</b>	<b>4,7%</b>	<b>3,2%</b>	<b>3,4%</b>	<b>10,5%</b>

**Tableau 3** : Contributions relatives des principaux vecteurs alimentaires d'exposition à l'OTA dans la population adulte de 12 pays européens. D'après Miraglia and Brera (2002).

#### II.4.3 Courbes de calibration

Les courbes de calibration relatives aux dosages de la  $\beta$ 2-microglobuline, de l'albumine et de la RBP et l'interpolation des valeurs individuelles de ces paramètres urinaires ont été déterminées, selon les recommandations du fournisseur, par régression de type Spline à l'aide du logiciel JMP© (version 5.1.2).

#### II.4.4 Étude des associations entre paramètres individuels et biologiques

Les facteurs de variation des indicateurs biologiques d'exposition et d'effet ont été recherchés :

- individuellement à l'aide de tests non-paramétriques : comparaison de moyennes basée sur les rangs de Wilcoxon pour les variables catégorielles (procédure SAS© : PROC NPAR1WAY) et coefficient de corrélation de Spearman pour les variables continues (procédure SAS© : PROC CORR) ;
- par régression linéaire avec approche pas-à-pas (SAS© : PROC REG, « stepwise approach ») et modèle linéaire généralisé (procédure SAS© : PROC GLM) après log-transformation des données ne remplissant pas les critères de normalité (statistique d'Anderson-Darling).

### III RESULTATS ET DISCUSSION

#### III.1 Réalisation pratique du pilote

##### III.1.1 Bilan de la phase de recrutement

Le pilote s'est déroulé du 23 au 27 juin 2004 dans 7 des 9 localités de la délégation de Bou Salem. Deux équipes de deux enquêteurs (un médecin et un infirmier) ont enquêté un total de 22 ménages, au sein desquels 65 personnes ont été interrogées, parmi lesquelles 59 ont été incluses, soit un taux d'inclusion de 91% et une moyenne de 12 personnes incluses par jour. La principale cause de non inclusion était les menstruations chez la femme. Le ratio femmes/hommes était de 1.46 : 35 femmes (59%) et seulement 24 hommes (41%). Cette différence d'effectif s'explique en partie par l'absence de huit personnes lors de la visite de leur foyer ( $\approx 11\%$  du total des personnes éligibles), dont cinq de sexe masculin ( $\approx 7\%$ ), chefs ou soutiens de famille partis travailler. D'après leur épouse (ou leur mère), ces hommes occupaient des emplois journaliers commençant tôt le matin et pour lesquels ils risquaient d'être pénalisés sur leur salaire en cas de retard. Il est important de prendre cet aspect en compte pour assurer la représentativité de l'échantillon dans le protocole principal (biais de sélection). Une solution pourrait être de se rendre très tôt le matin chez les personnes concernées avant leur départ au travail, ou de leur fournir un certificat de présence et de les indemniser pour la demi-journée, mesure dont le coût et la faisabilité restent à évaluer. L'option de se rendre sur le lieu de travail de la personne semble difficile d'un point de vue d'organisation du planning et d'acceptabilité.

##### III.1.2 Acceptabilité du recueil des informations et des échantillons

L'acceptabilité des questions et des prélèvements était excellente dans notre échantillon d'étude, ce en grande partie grâce à la présence d'un relai local assurant un lien entre les personnes enquêtées et les enquêteurs, ainsi qu'à l'aplomb humain de ces derniers.

La passation des questionnaires a toutefois pu poser problème dans le cas (fréquent) où la personne interrogée ne pouvait pas s'isoler avec l'enquêteur pour donner ses réponses, configuration systématique dans le cas où l'enquêteur et l'enquêté étaient de sexes opposés, ou tout simplement en raison de la disposition de l'habitat et de la curiosité des autres membres du ménage, en particulier des enfants et adolescents présents. Les questions relatives au tabagisme chez la femme, à la prise d'alcool chez les deux sexes (la femme étant souvent d'emblée écartée de cette catégorie de questions par l'enquêteur lui-même), à la date des dernières menstruations chez la femme, ou aux consommations alimentaires de certains aliments dits « de compléments » considérés plus luxueux et potentiellement consommés en cachette (certains gâteaux, la viande, les sodas) ont probablement dans certains cas reçu des réponses biaisées. Assurer la confidentialité de l'entretien est difficile dans ces conditions de terrain.

Enfin, dans le cas où les ménages enquêtés rencontraient manifestement des difficultés matérielles dans leur approvisionnement alimentaire quotidien, il est apparu indispensable de proposer une compensation sous la forme d'une collation pour tous les membres de la famille, enquêtés ou non, à la suite du prélèvement de sang. La question du dédommagement des prélèvements alimentaires, aussi modestes soient-ils quantitativement, doit impérativement être prise en considération.

### III.1.3 Prise en charge des personnes se prêtant à la recherche

En cas de résultat anormal lors des tests diagnostics réalisés (bandelettes urinaires et tension artérielle notamment), le participant en a été informé par le médecin-enquêteur et dirigé vers le centre de santé de base le plus proche de son domicile, voire vers l'hôpital. Le principal enseignement du pilote sur le plan organisationnel s'avère en fait humain : pour certaines des personnes enquêtées, une simple prise de la tension artérielle était un « acte médical » rare car coûteux : environ 1 Dinar Tunisien dans un centre de santé de base (CSB), avec à titre indicatif un Salaire Minimum Inter professionnel Garanti (SMIG) de 180 DT par mois, soit 5.8DT par jour (BIT/Chaabane 2003). Aussi, dans l'éventualité d'un dépistage ou d'une suspicion de problème de santé, qu'il soit en rapport ou non avec l'affection rénale étudiée, une lettre de liaison avec l'hôpital ou le CSB local devrait être remise à l'intéressé lui assurant l'exonération des analyses et des soins. Dans le cas de populations particulièrement isolées du système de santé, la présence d'un médecin assurant une « caravane santé », c'est-à-dire suivant l'équipe d'enquêteurs et recueillant les coordonnées des personnes ayant besoin d'une consultation médicale, permettrait de dissocier la dimension « enquête » de la prise en charge tout en assurant cette dernière pour un moindre coût. Cet aspect devrait être budgétisé et négocié avec les autorités sanitaires locales dans le cadre de l'enquête « grandeur nature ».

En conclusion, le dispositif d'enquête a dans l'ensemble démontré son efficacité, tant en matière de ressources humaines (binômes infirmier-médecin, présence d'un facilitateur sur le terrain - ici un des surveillants de l'hôpital-, appui du personnel de laboratoire local pour le conditionnement des échantillons biologiques) que du point de vue du matériel mobilisé. Certains aménagements sont cependant nécessaires quant à la question des absents et le relai vers les structures sanitaires locales ou la prise en charge médicale directe des participants le nécessitant.

## III.2 Caractéristiques générales et alimentaires

### III.2.1 Données anthropométriques, socio-culturelles, et habitudes de vie

Le tableau 4 consigne les valeurs des principaux paramètres anthropométriques, socioculturels et d'habitudes de vie d'intérêt. Avec toutes les réserves que la taille de notre échantillon impose, nous replaçons les résultats par rapport aux valeurs de ces paramètres en population générale.

L'âge moyen de notre échantillon est plus élevé chez les hommes (50 ans) que chez les femmes (41 ans), probablement lié au à la présence de jeunes femmes (filles du couple enquêté) habitant chez leurs parents jusqu'à l'âge du mariage, et à l'absence d'une partie des hommes en âge de travailler évoquée plus haut. La prévalence du surpoids ( $25 \leq \text{IMC} < 30$ ) et de l'obésité ( $\text{IMC} \geq 30$ ) est alarmante, en particulier chez les femmes, en accord avec les données nationales (Beltaifa et al. 2002). Ainsi, nous observons dans cet échantillon de population rurale et semi-rurale que 16.7% des hommes et 40.0% des femmes sont en surpoids, et 20.8% des hommes et 37.1% des femmes sont obèses, soit une prévalence globale de surpoids et obésité ( $\text{IMC} \geq 25$ ) de 61%, largement supérieure à la moyenne nationale de 41.8% (27.% de surpoids et 14.4% d'obésité) relevée en 1997 chez les 20-60 ans (Mokhtar et al. 2001). La prévalence d'hypertension artérielle (dépistée lors de la prise de tension par  $\text{PAS} \geq 140$  et/ou  $\text{PAD} \geq 90$  mm Hg) est également élevée : 16.7% chez les hommes et 11.4% chez les femmes, conduisant à une prévalence globale de l'HTA (traitée et dépistée) sensiblement égale dans les deux sexes (de 20.0 et 20.9%). Ces données sont globalement en accord avec les études tunisiennes à grande échelle (Ben Alaya et al. 2002).

Caractéristique	Hommes	Femmes	Total
N	24 (40,7%)	35 (59,3%)	59 (100,0%)
Âge (années)	50,0 (12,5)	41,0 (15,9)	44,7 (15,2)
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	25,0 (4,0)	29,0 (4,8)	27,4 (4,9)
HTA traitée	1 (4,2%)	3 (8,6%)	4 (6,8%)
PAS (mm Hg)	130,6 (25,3)	123,7 (16,1)	126,5 (20,4)
PAD (mm Hg)	74,2 (21,6)	76,6 (11,2)	75,6 (16,1)
Fumeur	16 (66,7%)	0 (0,0%)	16 (27,1%)
Ex-Fumeur	6 (25,0%)	1 (2,9%)	7 (11,9%)
Non-Fumeur	2 (8,3%)	34 (97,1%)	36 (61,0%)
Prise d'alcool	2 (8,3%)	0 (0,0%)	2 (3,4%)
Analgésiques	0 (0,0%)	6 (17,1%)	6 (10,2%)
Maladie rénale <sup>a</sup> < 6mois	2 (8,3%)	1 (2,9%)	3 (5,1%)
Maladie rénale <sup>a</sup> ≥ 6mois	3 (12,5%)	4 (11,4%)	7 (11,9)
Analphabétisme	4 (16,7%)	13 (37,1%)	17 (28,8%)
Actif occupant un emploi	20 (83,3%)	2 (5,7%)	22 (37,3%)
Aide Médicale Gratuite <sup>b</sup>	4 (16,7%)	6 (17,1%)	10 (16,9%)

**Tableau 4 : Caractéristiques de l'échantillon d'étude.**

Moyenne (ET) ou effectif (%) ; Pression Artérielle Systolique (PAS) et Diastolique (PAD)

a : maladie rénale ou du tractus urinaire diagnostiquée dans les 6 mois précédant l'enquête ou au de-là (lithiase rénale) b : AMG : couverture maladie des personnes indigentes et à faible revenu.

Le tabagisme n'a été déclaré par aucune femme de notre échantillon, tandis 66.7% des hommes disent fumer quotidiennement, soit une prévalence totale de 27.1%. Ces valeurs sont proches de celles obtenues en population générale en 1996 : prévalence de 63% chez les hommes en milieu rural, et prévalence nationale (hommes et femmes) de 30.4% (Fakhfakh et al. 2002). La prévalence de la déclaration de consommation d'alcool est faible chez l'homme (8.3%) et nulle chez la femme, en accord avec le fait que 98% de la population tunisienne est de religion musulmane. Elle est inférieure aux estimations relatives à l'abstinence : 70% chez les hommes et 95% chez les femmes (European Addiction Research 2001), possiblement en raison de la ruralité (corollaire d'une pratique religieuse régulière) et de l'indésirabilité sociale d'une consommation d'alcool encore largement taboue.

Nous ne disposons pas de données sur la fréquence de la consommation d'analgésiques en Tunisie, mais constatons que les femmes déclarent beaucoup plus fréquemment que les hommes avoir pris ou prendre actuellement des médicaments contre la douleur, ce qui est conforme aux observations internationales (Isacson and Bingefors 2002).

88% des femmes ont rapporté utiliser du kohl pour le maquillage des yeux, la plupart du temps de manière très occasionnelle (pour les fêtes, quelques fois seulement dans l'année, dans 50% des cas), 10% (3 femmes) et 20% déclarant respectivement une utilisation quotidienne et hebdomadaire.

La proportion d'hommes actifs occupant un emploi (83.3%) est supérieure au taux global d'activité masculine chez les 15 ans et plus (67.8%, INS) et la majorité des femmes se sont dites « au foyer » (74.3%), situation caractéristique du milieu rural. Aucun homme et seulement trois femmes (5.1%) se sont déclarés chômeurs, alors que le taux national est estimé à 13.9% avec peu de différences entre hommes et femmes (INS 2004). Les hommes actifs enquêtés occupent majoritairement des emplois d'ouvrier agricole et autre type de poste d'employé (25% chacun), de cadre moyen et artisan-commerçant (15% chacun) et d'ouvrier non agricole (10%).

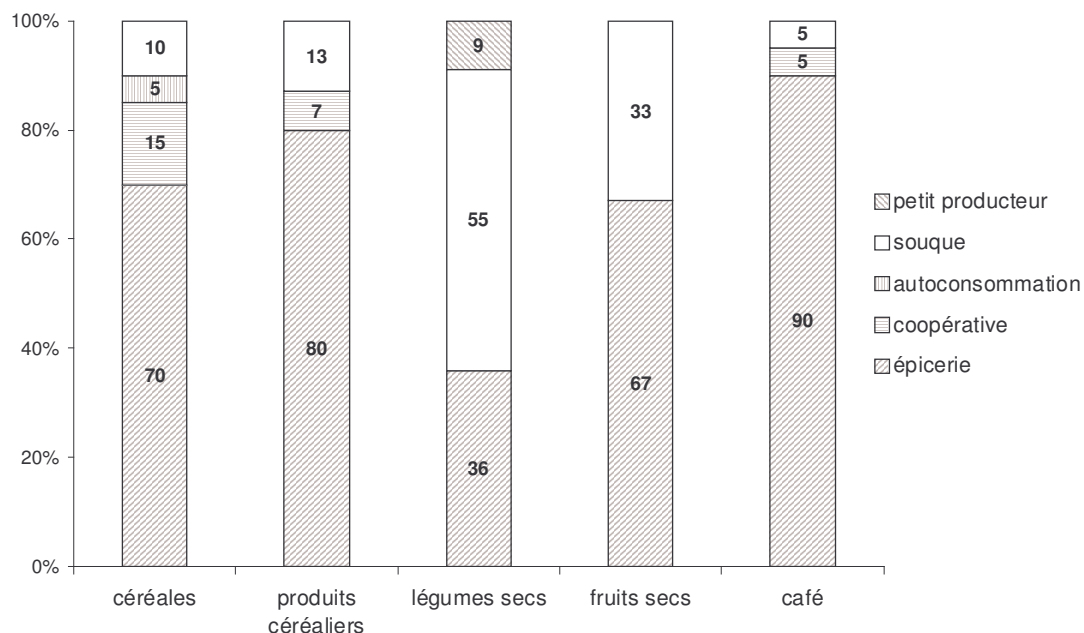
Le taux d'analphabétisme est légèrement plus important que la moyenne nationale des 10 ans et plus, probablement lié au milieu rural et au critère d'âge pour l'inclusion (20-79 ans) : 37 contre 31% chez les femmes, 17 contre 14% chez les hommes, soit un total de 29% contre 22% au niveau national (PNUD 2004). Toutefois, il est inférieur aux estimations régionales réalisées en 1999 par l'INS : entre 40 et 60% chez les femmes et de 20 à 40% chez les hommes dans le gouvernorat de Jendouba (Institut National de la Statistique 1999).

Enfin, l'affiliation au régime d'assurance maladie (partiellement) gratuit (AMG) concerne 16.9% de notre échantillon, très proche de la moyenne nationale de 17.2% (Association Internationale de la Sécurité Sociale 2004).

### III.2.2 Habitudes alimentaires

#### Approvisionnement alimentaire et habitudes de stockage

La figure 5 rapporte les lieux d'approvisionnement alimentaire déclarés par la personne en charge des courses dans chaque ménage. On constate une nette prédominance des achats en épicerie de quartier (entre 70 et 90% des achats de céréales et produits céréaliers, café et fruits secs), sauf pour les légumes secs majoritairement achetés au souque. L'autoconsommation de céréales est faible dans notre échantillon (5%). En revanche, le stockage domestique des céréales et produits céréaliers est pratiqué par tous les ménages sauf un et ce sur une durée de 12 mois en moyenne (d'une campagne céréalière à l'autre). Le stockage est généralement initié à l'été, après les récoltes, et réapprovisionné en cours d'année si nécessaire. Enfin, 70% des ménages déclarent ne jamais utiliser de plats traditionnels (de type émaillé) pour la cuisson, la présentation ou la conservation des aliments. Seulement 3 ménages (13%) rapportent une utilisation occasionnelle à exceptionnelle de ce type de vaisselle pour la cuisson des plats, et 2 (9%) un usage occasionnel pour la consommation des denrées.



**Figure 5** : Lieux d'achat des principaux groupes d'aliments vecteurs d'OTA.

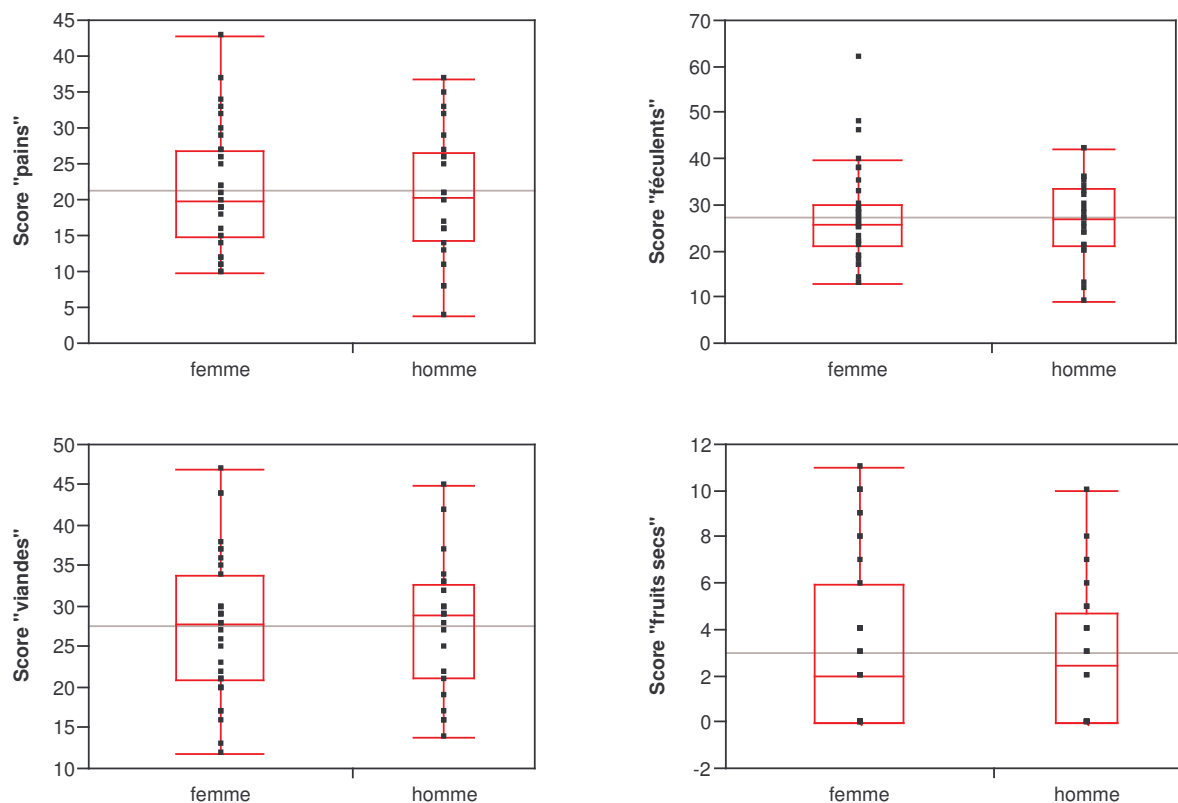
## Fréquence de consommation des aliments vecteurs

Nous avons retenu 52 des 80 items alimentaires du questionnaire de fréquence comme pouvant être vecteurs d'OTA dans la diète des personnes enquêtées. Le vin et la bière n'ont pas été inclus en raison de la rareté des déclarations de consommation.

Les items ont été regroupés en 5 catégories (voir le détail en annexe 5) : pains (comprenant pains et viennoiseries, aliments céréaliers à base de blé tendre), féculents (comprenant aliments simples et composés à base de blé dur, d'orge et de légumineuses), fruits secs (fruits et graines séchées), viandes (y compris plats composés) et café.

Afin de créer un score de fréquence de consommation de chacune de ces catégories, nous avons sommé les indicateurs de fréquence rapportés par chaque individu pour chaque item considéré dans la catégorie. La figure 6 consigne les distributions des scores de fréquence de consommation obtenus dans notre échantillon.

Nous constatons que les produits à base de blé tendre (pains de boulangerie, gâteaux et viennoiserie) sont presque consommés aussi souvent que les féculents à base de blé dur (couscous, semoule, boulgour), d'orge et d'autres céréales telles que le riz (score médian respectivement de 20 et 27).



**Figure 6 :** Distribution des scores de fréquence de consommation par groupe d'aliments et par genre. « box and whiskers » plots : le haut de la boîte est le P75, la ligne intermédiaire est la médiane, et le bas de la boîte est le P25 ; les « moustaches » délimitent les zones hors lesquelles une observation peut être considérée comme extrême (possible « outlier »).

## Ochratoxine A dans les aliments

Chaque ménage a fourni au moins un, si ce n'est deux ou trois, échantillons d'aliment à base de céréales tels qu'identifiés par l'enquêteur sur la base de la fréquence de consommation et du stockage domestique (annexe 5), soit un total de 37 analyses d'OTA sur céréales. Un échantillon complémentaire, généralement d'épices, a la plupart du temps été réalisé (20 prélèvements). Les résultats sont consignés au tableau 5. Le couscous et le mahmsa (blé concassé dédié à la préparation domestique de pâtes alimentaires) étaient les plus prélevés et les « plus contaminés ».

On observe un niveau global de contamination des céréales par l'OTA nettement inférieur à ceux observés en Europe. 35% de nos échantillons sont positifs au seuil de 0.01ng/g (LOQ), avec une moyenne de 0.043µg/kg et un maximum de 0.82µg/kg (maximum européen : 31.6µg/kg), moyenne proche de la situation observée en Italie (Miraglia and Brera 2002) où tous les échantillons testés (N=30) étaient en-dessous de la limite de détection (LOD=0.05). Or la dernière synthèse réalisée auprès de 13 États membres (Miraglia and Brera 2002) rapportait respectivement pour l'ensemble des céréales (N=5180) et le blé (N=979) des fréquences de contamination de 55% et de 28% (variant toutefois considérablement en fonction des limites de détection) avec des moyennes de 0.294µg/kg et 0.296µg/kg.

Concernant les épices, dont 57% présentaient des teneurs en OTA quantifiables au seuil de 0.01ng/g, la moyenne observée (0.48µg/kg) est de nouveau inférieure aux données Européennes (N=361), en particulier celles relatives à l'Europe du Sud (moyenne globale : 1.15, Europe du Nord : 0.98, Europe du Sud : 4.66 avec un maximum à 23.8µg/kg).

En conclusion, les niveaux de contamination retrouvés dans des aliments céréaliers de consommation courante dans la diète des ménages enquêtés sont faibles ; à titre indicatif, la norme européenne est actuellement de 5 et 3µg/kg pour les céréales et préparations à base de céréales. Ceci est d'autant plus intéressant que les prélèvements ont été effectués pendant la saison des récoltes (fin du mois de juin), donc en principe en fin de période de stockage annuel supposé être favorable au développement mycélien et à la production de toxines.

Aliment	>LOQ/total	>LOQ	µ±ET <sup>a</sup>	µ±ET <sup>b</sup>	Max
Couscous (BD)	10/20	50%	0.065±0.181	0.128±0.246	0.82
Mhamsa (BD)	3/5	60%	0.087±0.098	0.053±0.083	0.20
Semoule (BD)	0/2	-	-	-	-
Smid (BT)	0/1	-	-	-	-
Bsissa (BT)	0/6	-	-	-	-
Chorba (orge)	0/3	-	-	-	-
<b>Total céréales</b>	<b>13/37</b>	<b>35%</b>	<b>0.043±0.138</b>	<b>0.118±0.218</b>	<b>0.82</b>
Pois-chiches	1/1	100%	0.03	-	0.03
<b>Épices variées</b>	<b>12/20</b>	<b>57%</b>	<b>0.478±1.452</b>	<b>0.796±1.835</b>	<b>6.53</b>

BD : blé dur ; BT : blé tendre ; a : en remplaçant les données <LOQ par LOD/2 ;  
b : à l'exclusion des valeurs <LOQ ; LOQ=0.01ng/g

**Tableau 5** : Teneurs en OTA (µg/kg) dans différents aliments prélevés chez les ménages.

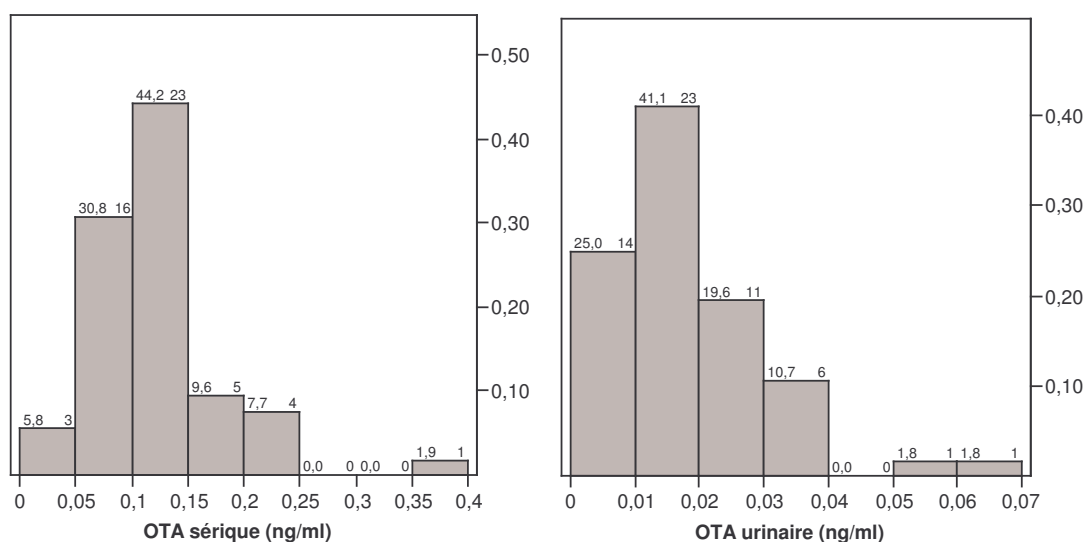
### III.2.3 Score alimentaire d'exposition à l'OTA

Nous ne trouvons aucune association statistiquement significative entre le score d'exposition « céréales » ( $Z_i^{céréales}$ ) et les teneurs sériques et urinaires en OTA, ce à quoi nous pouvions nous attendre dans la mesure où en moyenne une seule donnée de contamination était disponible par ménage et que seuls les aliments céréaliers étaient pris en compte pour l'estimation de l'exposition. En revanche, le score pondéré ( $Z_i^{pondéré}$ ) présente une association significative avec l'OTA urinaire au seuil des 10% ( $p=0.08$ ). Ceci tendrait à confirmer que l'OTA dosée dans les urines constitue un indicateur pertinent d'exposition alimentaire à l'OTA. Toutefois, ces résultats sont très sensibles au mode de calcul adopté, aussi bien pour la détermination des fréquences relatives de consommation, le choix des items à inclure dans chaque groupe (un « couscous viande » rentre-t-il par exemple plutôt dans la catégorie « féculents » ou « viande » ?), que les facteurs de pondération tels que décrits au II.4.2. p49.

### III.3 Ochratoxine A dans le sérum et les urines

#### III.3.1 Distribution des indicateurs d'exposition

L'OTA a été retrouvée et quantifiée dans tous les sérums testés sauf deux ( $N=54$ , LOQ : 0.01 ng/ml) en raison de la présence d'un pic d'interférence probablement lié à un phénomène de co-élution d'un des composants de la matrice. Les résultats présentés au tableau 7 et à la figure 7a ont été corrigés par le pourcentage de récupération moyen (61.5% à 1ng/ml avec une répétabilité - RSDr - de 8%). Pour les mêmes raisons, quoique concernant des individus distincts, l'OTA n'a pas pu être quantifiée dans deux échantillons d'urine ( $N=57$ , LOQ : 0.001 ng/ml, taux de récupération de 96 à 100%, RSDr de 1 à 3%). L'OTA doit donc être fréquemment présente dans l'alimentation des personnes enquêtées, quoiqu'à des niveaux moindres que ceux attendus au vu de nos hypothèses de travail (cf. protocole principal II.2), du moins durant la période des quelques mois précédent l'enquête. Les figures 7a et 7b consignent les distributions des teneurs sériques et urinaires retrouvées dans notre échantillon.



**Figure 7 :** Distribution empirique (pourcentage et effectif) des indicateurs d'exposition à l'OTA. a : OTA sérique, b : OTA urinaire.

## OTA sérique

Les teneurs sériques d'OTA observées sont très inférieures à celles rapportées précédemment en Tunisie chez des sujets en bonne santé (voir tableau 6) mais proches des données allemandes ( $\mu=0.23$ ), libanaises ( $\mu=0.17$ ), norvégiennes ( $\mu=0.18$ ) ou suédoises ( $\mu=0.21$ ). En effet, l'OTA sérique varie entre 0.011 et 0.350 ng/ml avec une moyenne de 0.120 ng/ml, alors que Bacha et al. (1993), Abid et al. (2003) et Hassen et al. (2004) rapportent des moyennes variant de 1.22 (année 2000) à 3.5 ng/ml (année 1991), avec un maximum observé à 10 ng/ml, et deux cas « aberrants » à 42 et 100 ng/ml. Une première explication serait que les résultats relatifs aux années 1991 et 1994 sont difficilement comparables aux autres du fait de la LOD de 1 ng/ml qui « gonfle » la moyenne observée. Cependant, ce phénomène doit être « marginal » puisque 77 à 82% des échantillons étaient positifs à ce seuil de détection.

De même, les moyennes des teneurs observées avec une LOD de 0.1 ng/ml en 1997 et 2000 demeurent élevées quoiqu'en recul en 2000 par rapport à la période passée. Enfin, les teneurs dosées par une autre équipe en 2002 avec une LOQ de 0.1 ng/ml sont intermédiaires ( $\mu=0.53$  contre 1.22 en 2000 et 0.12 en 2004).

N	LOD	>LOD	Min-Max	$\mu\pm ET$	Année	Région	Référence
442	1	82%	1.00-10.00	<b>3.50</b> $\pm$ 6.80	1991	Multi-centrique : Tunis (nord), Jendouba (nord-ouest) Sousse-Monastir (centre), Sfax (sud)	(Bacha et al. 1993)
140	1	77%	1.70-2.80	<b>2.25</b> $\pm$ 2.00	1994	Multi-centrique : Tunis (nord), Jendouba (nord-ouest) Sousse-Monastir (centre), Sfax (sud), Gafsa (sud-ouest)	(Abid et al. 2003)
20	0.1	71%	0.00-7.50	<b>2.60</b> $\pm$ 2.30	1997	Monastir	(Hassen et al. 2004)
20	0.1	62%	0.00-3.20	<b>1.22</b> $\pm$ 1.20	2000		
62	0.1 (LOQ)	100%	0.12-8.06	<b>0.53</b> $\pm$ 1.00	2002	Monastir-Sousse	(Grosso et al. 2003)
52	0.01	100%	0.01-0.35	<b>0.12</b> $\pm$ 0.06	2004	Jendouba	OTARI (non publié)

**Tableau 6** : Teneurs sériques en OTA (ng/ml) dans différents échantillons de la population tunisienne.

La faiblesse des teneurs biologiques moyennes (0.12 ng/ml) et maximales (0.35 ng/ml) que nous observons à Bou Salem est surprenante à plusieurs titres :

- la région de Jendouba est celle pour laquelle nous avons postulé que l'exposition serait parmi les plus élevées en Tunisie ;
- les prélèvements biologiques ont été réalisés au mois de juin, période de l'année où la variabilité saisonnière est censée aller dans le sens d'une plus forte exposition-« imprégnation » ;
- les personnes enquêtées pratiquent un stockage domestique annuel des céréales (21 ménages sur 23).

Avec toutes les réserves que la non-représentativité des groupes enquêtés impose, le rôle du hasard par insuffisance de l'effectif observé ne pouvant être écarté, nous pouvons proposer deux interprétations permettant de mettre nos résultats en perspective par rapport aux enquêtes précédentes.

La première postule une diminution régulière de l'exposition de la population tunisienne au

cours des 10 dernières années, ce même en milieu rural, diminution qui pourrait être liée à une amélioration constante des conditions d'approvisionnement et de stockage des aliments jusqu'ici vecteurs d'OTA dans la diète tunisienne, et/ou à une désaffection pour ces aliments de type traditionnel longs à préparer. Jaouadi (2000) relèvent en effet plusieurs tendances dans la consommation alimentaire tunisienne entre 1975 et 1990 qui probablement se sont accentuées depuis, notamment une diminution de la consommation de céréales en général, et des effets de substitution dans ce groupe d'aliments de base entre blé dur et blé tendre dont on a vu les différences de susceptibilité à la contamination par l'OTA. Ainsi, l'auteur relève en milieu rural, et dans une moindre mesure dans les petites communes :

- un recul appréciable de la consommation d'orge et, quoiqu'à un degré moindre, de blé dur, toutes deux céréales traditionnelles autoconsommées et dominant jusqu'alors la diète chez le rural sous la forme de semoule et de couscous préparés par les femmes ;
- une nette progression (effet de substitution) de la consommation de produits à base de blé tendre, en particulier les produits manufacturés « prêts à consommer » et en particulier le pain de boulangerie, produits de plus en plus bon marché et plus simples d'utilisation pour le ménage dans un contexte de réduction du temps de travail de la femme à la maison, de disparition progressive du savoir-faire traditionnel chez les plus jeunes, de modernisation de l'habitat et de développement agro-alimentaire bon marché.

Nous avons nous-mêmes observé l'importance prise par les produits à base de blé tendre dans l'alimentation de cette population (semi-)rurale, avons noté que seul le blé dur était stocké par les ménages, et que les niveaux de contamination rencontrés étaient bas. Reste à savoir si cette observation fait règle ou ne représente qu'un microphénomène de nature plus temporelle que géographique.

C'est ici qu'intervient une seconde interprétation : les teneurs observées à Bou Salem pourraient s'expliquer par des conditions climatiques au cours de l'année 2004 particulièrement défavorables au développement des moisissures et/ou à la production de mycotoxines telles que l'OTA. Les échantillons alimentaires recueillis auprès des ménages présentent en effet des teneurs d'OTA remarquablement basses, ce qui va dans le sens d'une exposition très modérée des personnes enquêtées, au moins pendant la période précédant notre étude.

Cette dernière hypothèse relative à une forte variabilité annuelle des niveaux de contamination, reflétée par les niveaux d'OTA sérique correspondant en principe à l'exposition au cours des quelques mois précédents, tendrait à être corroborée par les résultats obtenus en 1993 par (Eko-Ebongue et al. 1994), quoique sur un échantillon de 30 personnes : seulement 20% des sérums (soit 6 personnes, avec une LOD de 0.1ng/ml) étaient positifs et les teneurs variaient entre 0.12 et 1.48ng/ml, très en dessous des teneurs observées en 1991 et 1994 (cf. tableau 5).

En conclusion, les résultats préliminaires obtenus ici tendent à infirmer l'hypothèse d'une forte exposition à l'OTA de la population tunisienne résidant dans le gouvernorat de Jendouba, du moins pendant la période d'enquête à l'été 2004. Elles indiquent de toute évidence que si tant est que l'exposition puisse atteindre des niveaux particulièrement élevés dans cette région de Tunisie (ce que nous n'observons pas ici), ce phénomène est probablement hautement dépendant des conditions climatiques de l'année, et donc par nature cyclique sinon transitoire. Le plan de surveillance national des mycotoxines dans l'alimentation, initié en 2004 par le Ministère de la Santé Publique tunisien et dont le LRSBC

est le principal prestataire de services, devrait nous éclairer à ce sujet dans un avenir proche.

#### OTA urinaire

La prévalence de l'OTA dans les urines des personnes enquêtées est de 100%, supérieure aux observations faites dans diverses populations en bonne santé, quoique la comparaison soit rendue difficile par la différence des limites de détection. Les niveaux observés dans notre échantillon sont en revanche comparables à ceux précédemment publiés : une teneur moyenne de 0.018 ng/ml et un maximum à 0.069 ng/ml après exclusion d'une observation « extrême » à 0.265 ng/ml qui ne présentait pas par ailleurs d'élévation/diminution de l'OTA sérique. Là encore, cet indicateur d'exposition ne semble pas confirmer l'existence d'un problème particulier de contamination des denrées alimentaires dans la zone d'étude, tout au moins durant l'année de l'enquête.

Les niveaux urinaires et sanguins d'OTA présentent une association faible ( $R^2=0.17$ ) mais statistiquement significative ( $p=0.003$ ) comparable à celle retrouvée par Gilbert et al. (2001) sur échantillons composites constitués sur un mois ( $R^2=0.13$ ,  $p=0.017$ ). Toutefois, le rapport  $OTA_{\text{sérique}}/OTA_{\text{urinaire}}$  est dix fois inférieur dans notre étude que dans celle de Gilbert (9 en moyenne contre 80), en accord avec la faiblesse des niveaux sériques observés associée à des niveaux urinaires comparables.

Cette différence pourrait indiquer l'existence d'un phénomène de saturation des mécanismes d'élimination de l'OTA par la voie urinaire, saturation qui aurait été atteinte dans le groupe de volontaires anglais suivis par l'équipe de Gilbert, mais pas dans le nôtre au vu du faible niveau global d'exposition tel que rapporté par l'OTA sérique. Cette dernière interprétation mettrait en doute le bienfondé de l'utilisation de l'OTA urinaire comme marqueur d'exposition. Toutefois, chez la plupart des espèces animales testées et en particulier le rat, entre 2 et 10% de l'OTA administrée oralement est éliminée dans les urines (Galtier 1991; Storen et al. 1982; Zepnik et al. 2003), ce qui - en supposant une biodisponibilité moyenne de 50%, donc que 50% de l'OTA administrée se retrouve dans la circulation générale - implique qu'en situation stationnaire le ratio  $OTA_{\text{sérique}}/OTA_{\text{urinaire}}$  soit de l'ordre de 5 à 25, c'est-à-dire d'un ordre de grandeur proche de celui que nous observons.

D'autres études en population humaine quantifiant ce rapport pourraient nous éclairer à ce sujet, notamment celles pour lesquelles les dosages d'OTA seraient réalisés sur un spot urinaire prélevé le même jour que l'échantillon sanguin, comme c'est le cas ici.

Dans un cas (pilote OTARI) comme dans l'autre (Gilbert et al. 2001), la variabilité inter-individuelle est importante et du même ordre de grandeur (CV respectivement de 78 et 71%), probablement en rapport à des facteurs individuels de variations du métabolisme des xénobiotiques tels que le genre, l'âge, des facteurs génétiques relatifs notamment aux cytochromes P450 ou encore l'état de la fonction rénale.

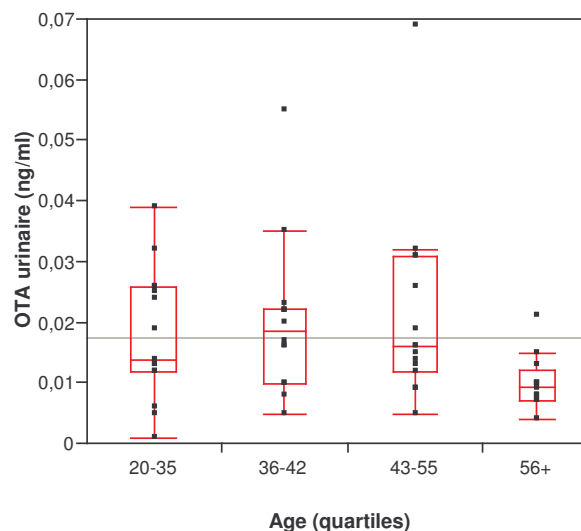
### III.3.2 Facteurs de variation des indicateurs d'exposition

#### Facteurs anthropométriques et habitudes de vie

Aucune des variables testées (âge, IMC, TAD, TAS, taille, poids, DFG, consommation de tabac) n'est associée aux teneurs d'OTA sérique dans notre échantillon. Seuls l'âge ( $r=-0.267$ ,  $p=0.047$ ), et la prise de médicaments antidouleur chez les femmes ( $p=0.046$ ) présentent une association individuelle significative ou à la limite de la significativité avec les teneurs

urinaires d'OTA. Testées dans le cadre d'une régression linéaire multiple incluant l'âge, le sexe, l'indice de masse corporelle, la présence d'une hypertension artérielle (ou les pressions artérielles systolique et diastolique) et le débit de filtration glomérulaire, aucune association statistiquement significative n'a été retrouvée avec l'OTA urinaire.

La diminution des taux urinaires chez les plus âgés a été observée par Gilbert et al. (2001) et pourrait être liée à une moindre efficacité des mécanismes d'élimination de la toxine. Afin de mieux cerner les effets de l'âge, nous avons comparé les moyennes d'OTA urinaire dans les quatre quartiles d'âge de notre échantillon (moyennes significativement différentes,  $p=0.03$  ; voir la figure 8). C'est le groupe d'âge des 36-55 ans qui présente les taux urinaires les plus élevés ( $\mu=0.020$  ng/ml), les plus jeunes (20-35 ans) et plus âgés (56 ans et plus) ayant respectivement une teneur moyenne de 0.018 et 0.010 ng/ml. Les taux sériques ne varient significativement ni avec l'âge ni avec le sexe dans notre échantillon, contrairement à la tendance (à la limite de la significativité) observée par Gilbert et al. (2001). En revanche, le ratio OTA\_sérique/OTA\_urinaire est significativement élevé ( $p=0.03$ ) chez les 60 ans et plus, en accord avec la diminution des taux urinaires avec l'âge, même à taux sériques sensiblement constants.



**Figure 8** : Distribution de l'OTA urinaire selon l'âge. « box and whiskers » plots.

### Facteurs alimentaires

Aucune corrélation significative n'a été retrouvée entre les teneurs sériques d'OTA et la consommation de 46 items alimentaires identifiés comme potentiellement vecteurs d'OTA. Par ailleurs, seules les fréquences de consommation de biscuits ( $r=0.338$ ,  $p=0.054$ ), de gâteaux ( $r=0.575$ ,  $p=0.005$ ), de volaille ( $r=0.372$ ,  $p=0.006$ ) et de café ( $r=0.302$ ,  $p=0.058$ ) sont significativement corrélées à l'OTA urinaire dans notre échantillon au seuil de 5%. De plus, lorsque les items individuels sont regroupés en 4 catégories : pains, féculents, fruits secs et viandes (cf. III.2.2. p55), la consommation de viandes est significativement corrélée à l'OTA urinaire au seuil de 10% ( $r=0.228$ ,  $p=0.091$ ).

Testé dans le cadre d'une régression linéaire multiple sur les items alimentaires après exclusion des aliments pour lesquels le nombre de consommateurs est inférieur à 10 (15 items

exclus sur 46) et en suivant une approche pas-à-pas, les effets « semoule » ( $p=0.006$ ), « couscous viande » ( $p=0.013$ ), « assiba » (pâte à base de farine de blé, huile, dattes et miel ;  $p=0.008$ ), « viande sans autre précision » ( $p<0.0001$ ), « viande de volaille » ( $p<0.0001$ ), « tajine » (pain berbère à base de blé ;  $p=0.011$ ) et « sandwich-casse-croute » ( $p=0.012$ ) sont significatifs au seuil de 5%. Enfin, aucune des 5 catégories d'aliments ne présente d'association significative avec l'OTA urinaire.

Ces résultats sont à prendre avec réserve au vue de l'effectif considéré, du grand nombre de variables testées (qui augmente les chances qu'une des corrélations au moins soit significative « par hasard »), de la sensibilité des résultats des modèles de régression au mode de calcul du score de fréquence de consommation et au choix de regroupement ou non d'items individuels en sous-catégories (par exemple les items « semoule », « couscous viande » et « couscous légumes » regroupés en une sous-catégorie « couscous » impliquent un effet « couscous » significatif mais l'« entrée » ou la « sortie » de certains autres items du modèle). De plus, les consommations étudiées sont immanquablement corrélées entre elles et dans le cadre d'un échantillon de grande taille, cette information devrait être prise en compte.

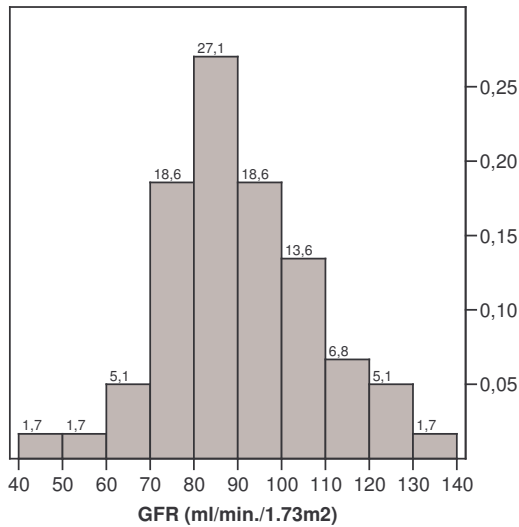
### III.4 Marqueurs urinaires de toxicité rénale

Le tableau 7 rapporte les statistiques descriptives générales de la distribution des paramètres rénaux dosés (créatinine sérique, créatinine urinaire, albumine,  $\beta$ 2microglobuline, RBP, NAG) et/ou calculés (clairance de la créatinine, débit de filtration glomérulaire).

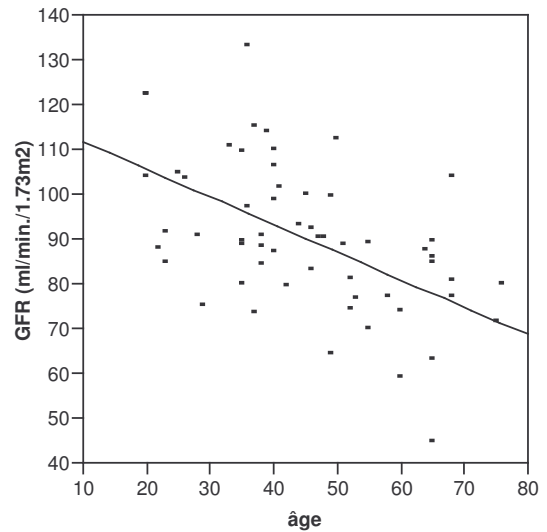
#### III.4.1 Distribution des indicateurs d'effets

##### Débit de filtration glomérulaire (DFG ou GFR) et protéinurie

La distribution des valeurs du débit de filtration glomérulaire (calculés par l'équation MDRD, voir protocole principal) est rapportée à la figure 9. C'est sur la base du degré de diminution du DFG, interprété en fonction de l'âge, de la durée et de la présence de lésions rénales telles que la protéinurie et l'albuminurie, que sont actuellement définis les stades de la pathologie rénale chronique en pratique clinique (K/DOQI 2002). Seulement deux personnes, deux femmes âgées de 60 et 65 ans, présentaient un débit inférieur à  $60 \text{ ml/min./1.73m}^2$  en l'absence toutefois d'anomalies urinaires laissant supposer des lésions rénales et la présence d'une pathologie rénale chronique. En revanche, 30 sujets présentaient un débit de filtration glomérulaire « réduit » (compris entre  $60$  et  $89 \text{ ml/min./1.73m}^2$ ). Cependant, le DFG est fortement inversement corrélé à l'âge du fait du processus naturel de vieillissement du rein, tendance que nous retrouvons dans notre échantillon d'étude ( $r=-0.547$ ,  $p<0.0001$  ; cf. figure 10). En tenant compte de l'influence de l'âge, seulement une femme âgée de 65 ans présentait un DFG ( $44.6 \text{ ml/min./1.73m}^2$ ) à peine inférieur à l'intervalle « normal » de fluctuation par rapport à sa classe d'âge tel que défini par le K/DOQI (2002) ( $46-104 \text{ ml/min./1.73m}^2$  chez les femmes de 60-69 ans) et un homme âgé de 35 ans un DFG inférieur à  $90$  ( $88.7 \text{ ml/min./1.73m}^2$  ; borne inférieure chez les 30-39 ans :  $70 \text{ ml/min./1.73m}^2$ ) dont les urines étaient également positives au test de protéinurie. L'ensemble des individus de notre échantillon d'étude présente donc en première approche une fonction rénale « normale ».



**Figure 9** : Distribution empirique (pourcentage) du DFG.



**Figure 10** : Régression linéaire DFG=f(âge)

#### Albumine urinaire

La figure 11a illustre la distribution des valeurs observées pour l'albumine urinaire. Aucune ne dépasse le seuil de définition de la microalbuminurie (30 à 299 mg/g créatinine) (American Diabetes Association 2001) et les valeurs sont dans l'ensemble inférieures d'un facteur deux à celles rapportées comme « normales » dans différentes populations (Bernard and Lauwerys 1991; Mutti et al. 1992; Taylor and al. 1997), ce qui peut s'expliquer par le fait que nous avons réalisé nos prélèvements le matin et que les teneurs urinaires en albumine sont reconnues comme plus faibles pendant la nuit que durant le jour (Watts et al. 1988). De même, la médiane (2.26 mg/g créatinine) est proche de celle rapportée dans des populations en bonne santé participant à l'International Study of Macronutrients and Blood Pressure (Dyer et al. 2004). Parmi les deux personnes ayant une protéinurie positive par bandelettes urinaires, la concentration urinaire en albumine ne confirme pas l'existence d'une protéinurie, même modérée. En conclusion, l'intégrité glomérulaire semble préservée chez l'ensemble des personnes enquêtées.

#### β2microglobuline urinaire

Les valeurs observées (figure 11b) pour la β2microglobuline urinaire sont beaucoup plus élevées que celles couramment rencontrées en population générale. En effet, la seule moyenne (0.749 mg/g créatinine) dépasse de loin la valeur maximale de référence proposée par Bernard et al. (1997) de 0.300 mg/g créatinine. Elle est aussi supérieure aux observations faites en Tunisie sur deux groupes de 20 personnes en bonne santé (moyennes de 0.090 et 0.120 et maximums de 0.470 et 0.220 mg/l), puisque nous obtenons une moyenne de 0.976 et un maximum de 8.953 mg/l avant correction sur la créatinine urinaire. Cette observation pourrait s'expliquer par le fait que le dosage a eu lieu sur les urines du matin, plus concentrées par une nuit sans miction que celles de la journée. Ce sont pourtant les secondes urines que nous avons prélevées, et au vu de l'instabilité de la β2M aux pH urinaires inférieurs à 5.5 et à la température corporelle, on s'attendrait davantage à une sous-estimation des concentrations qu'à des teneurs « anormalement » élevées.

	Hommes			Femmes			Total		
	N	μ (ET)	Min-Max	N	μ (ET)	Min-Max	N	μ (ET)	Min-Max
OTA_U (ng/ml)	22 <sup>a</sup>	0.018 (0.014)	0.006-0.069	34	0.017 (0.012)	0.001-0.055	56 <sup>a</sup>	0.018 (0.012)	0.001-0.069
OTA_S (ng/ml)	21	0.131 (0.051)	0.044-0.227	31	0.113 (0.063)	0.011-0.350	52	0.120 (0.059)	0.011-0.350
OTA ingérés (ng/kg p.c./j) (Formule de Klaassen)	21	0.176 (0.069) <sup>b</sup> 0.258 (0.101) <sup>c</sup>	0.059-0.304 0.087-0.447	31	0.151 -0.084) <sup>b</sup> 0.222 (0.124) <sup>c</sup>	0.015-0.469 0.022-0.690	52	0.161 (0.079) <sup>b</sup> 0.237 (0.115) <sup>c</sup>	0.015-0.469 0.022-0.690
Créatinine_S (mg/l)	24	9.7*** (1.2)	7.1-12.7	35	7.8*** (1.3)	6.2-12.8	59	8.6 (1.6)	6.2-12.8
Créatinine_U (g/l)	24	2.04* (0.91)	0.52-3.73	35	1.44* (0.83)	0.16-3.02	59	1.68 (0.91)	0.16-3.73
Cl créatinine <sup>d</sup> (ml/min.)	24	90.8* (25.7)	49.6-155.8	35	104.6* (20.9)	52.9-136.0	59	99.0 (23.7)	49.6-155.8
DFG <sup>e</sup> (ml/min./1.73m <sup>2</sup> )	24	89.8 (15.0)	64.4-133.1	35	91.1 (18.4)	44.6-122.4	59	90.6 (17.0)	44.6-133.1
Albumine_U (mg/g créatinine)	17	2.18 (1.63)	0.37-6.48	22 <sup>a</sup>	2.60 (1.32)	0.50-5.77	39 <sup>a</sup>	2.42 (1.43)	0.37-6.48
β2M_U (mg/g créatinine)	17	0.435* (0.272)	0.130-0.997	23	0.981* (0.872)	0.132-3.231	40	0.749 (0.731)	0.130-3.231
RBP_U (mg/g créatinine)	17	0.137 (0.112)	0.027-0.503	22 <sup>a</sup>	0.124 (0.069)	0.030-0.302	39 <sup>a</sup>	0.130 (0.089)	0.027-0.503
NAG (U/g créatinine)	19	3.5 (1.6)	1.8-8.2	28	4.2 (3.3)	0.5-13.3	47	3.9 (2.7)	0.5-13.3
Protéinurie (bandelette réactive)	24	2 (8.3%)	0.3 ≤ x < 100 mg/l	35	0 (0%)	-	59	2 (3.4%)	0.3 ≤ x < 100 g/l

a : exclusion d'une valeur extrême (OTA\_U=0.265 ng/ml, ALB=17.85 mg/g créatinine et RBP=2.082 mg/g créatinine), liés à très faible créatine urinaire cf. valeurs non ajustées (ALB=7.48mg/l et RBP=0.330mg/l) ; b : Hagelberg et al. 1989 ; c : Schlatter et al. 1996. d : clairance de la créatinine (Cockroft & Gault 1976) ; e : débit de filtration glomérulaire (DFG équation MDRD, Levey et al. 1999) ;  
Test de Wilcoxon : différence entre les moyennes statistiquement significative : \* : p<0.05 ; \*\*\* : p<0.001.

**Tableau 7** : Caractéristiques biologiques de l'échantillon d'étude.

Il est donc plus probable que ces observations « aberrantes » soient liées à un défaut de fabrication ou plutôt d'utilisation du kit ELISA, sauf à admettre l'existence d'une source d'exposition locale à un néphrotoxique environnemental tel que le plomb ou le cadmium. Ainsi, à la lumière des résultats obtenus en population belge sur les variations des teneurs urinaires en  $\beta$ 2M en fonction des expositions professionnelles au Cadmium et leur interprétation « clinique » (Bernard et al. 1997), seulement 30% des personnes observées seraient indemnes de troubles rénaux ( $\beta$ 2M $\leq$ 300  $\mu$ g/g créatinine), 50% présenteraient les signes biologiques d'une tubulopathie à un stade précoce et possiblement réversible en cas de suppression de la source d'exposition ( $300 < \beta$ 2M $\leq$ 1000), et 20% présenteraient une protéinurie tubulaire irréversible ( $1000 < \beta$ 2M $\leq$ 10 000) compatible avec l'absence de diminution visible du DFG. Les résultats obtenus pour la RBP, pour laquelle les mêmes seuils ont été définis, devraient nous éclairer sur l'interprétation la plus probable.

#### RBP urinaire

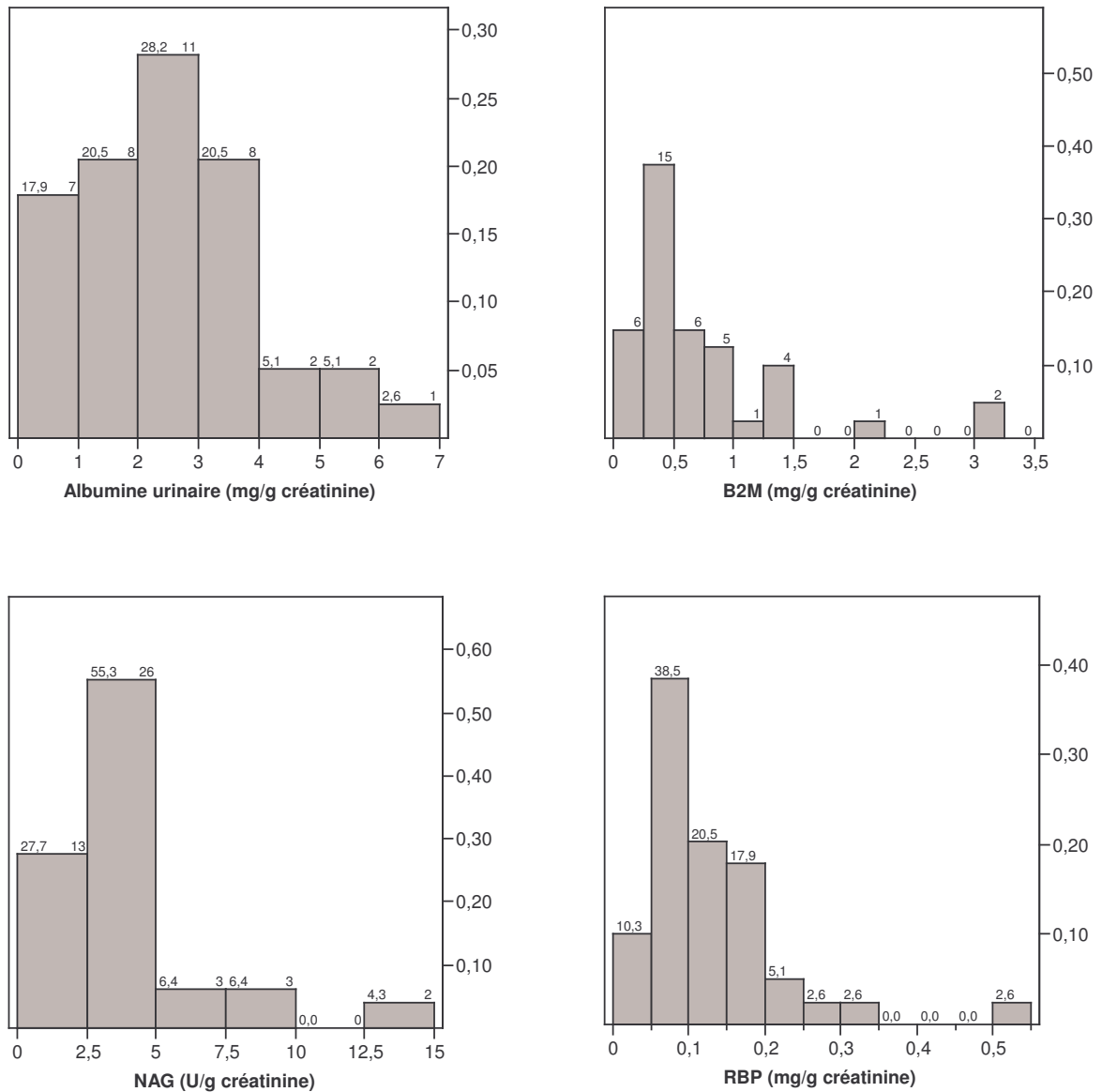
La retinol-binding protein (RBP) est comme la  $\beta$ 2M réabsorbée au niveau du tubule proximal avec une efficacité de 99.97% de sorte que ces deux protéines de faible masse moléculaire sont des marqueurs similaires de l'intégrité tubulaire, à ceci près que la RBP est stable dans les urines acides et ne nécessite pas de précautions particulières lors de la collecte des urines. Il est donc communément admis que ce marqueur est plus fiable et nous nous référerons par la suite aux résultats obtenus sur la RBP et non pas la  $\beta$ 2M pour discuter l'état de la réabsorption et de la sécrétion tubulaires chez les personnes enquêtées.

Bernard et al. (1997) ont proposé les mêmes valeurs seuils pour la RBP que la  $\beta$ 2M concernant l'interprétation « clinique » des dosages urinaires. Dans notre échantillon, seul un homme hypertendu âgé de 41 ans présente une concentration urinaire de RBP anormalement élevée (0.503 mg/g créatinine), signe biologique d'un stade précoce de tubulopathie ne s'accompagnant pas d'une diminution du DFG ou de quelque autre signe biologique. L'intégrité tubulaire semble donc préservée chez les personnes enquêtées, ce que les résultats relatifs à la NAG vont permettre d'élucider plus avant.

#### NAG urinaire

La N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase, enzyme lysosomal des cellules de la bordure en brosse du tubule rénal, est un indicateur sensible de lésions tubulaires précoces. En fonction des valeurs de référence considérées (NAG exprimée en U/g créatinine (Boege 1998) : <5.8 chez l'homme et <8.2 chez la femme ; ou en U/mmol créatinine (Jung et al. 1992) : <1.06 chez l'homme et <1.18 chez la femme), 2 à 5 personnes présentent des teneurs urinaires anormalement élevées sans autre signe biologique d'atteinte rénale.

L'ensemble des résultats obtenus sur les marqueurs urinaires indique une absence globale de manifestations néphrotoxiques précoces, en accord avec la faiblesse des niveaux d'exposition à l'OTA observée dans notre échantillon d'étude.



**Figure 11** : Distribution empirique (pourcentage - effectif) des indicateurs urinaires d'effet toxique rénal - a : albumine, b :  $\beta$ 2microglobuline, c : NAG, d : RBP

#### III.4.2 Facteurs de variation des indicateurs d'effets

En plus de l'âge évoqué plus haut, le DFG est significativement corrélé à l'albumine ( $r=0.385$ ,  $p<0.0001$ ), à la RBP ( $r=0.337$ ,  $p=0.036$ ) et à l'IMC ( $r=-0.310$ ,  $p=0.017$ ). Comme attendu, la RBP est par ailleurs corrélée à la NAG ( $r=0.457$ ,  $p=0.003$ ). Dans le cadre d'une régression linéaire multiple incluant les facteurs de variations habituels (âge, sexe, IMC, GRF et tabac), seul le DFG demeure significativement associé à l'albumine ( $p=0.004$ ). Enfin, aucune association n'a été retrouvée entre les marqueurs urinaires de toxicité rénale et l'OTA urinaire, ni par corrélation, ni par régression, ni par analyse de variance sur les percentiles extrêmes d'exposition (P10 versus P90).

#### IV CONCLUSIONS

Les résultats de cette étude pilote n'indiquant ni exposition anormalement élevée de la population enquêtée, ni, de manière cohérente, de manifestations toxiques au niveau rénal pendant la période d'étude, nous interpellent et posent diverses questions. Existe-t-il une tendance globale à la diminution des expositions en Tunisie au cours des deux dernières décennies? Avons-nous plutôt été témoins de la forte variabilité annuelle des niveaux de contamination et d'exposition à l'OTA? Ou encore, les biais inhérents à notre dispositif de terrain nous ont-ils empêchés d'appréhender la réalité?

Plusieurs remarques peuvent ici être faites.

- Les 59 personnes enquêtées sont issues de seulement 22 ménages, ce qui est susceptible d'avoir artificiellement réduit la variabilité inter-individuelle des expositions et par la même diminué les chances d'inclure des individus très exposés. Ceci nous renseigne toutefois sur le fait qu'au vu de l'effectif total de l'étude OTARI grandeur nature, le nombre de personnes présentant une élévation significative de l'exposition à l'OTA risque d'être réduit, diminuant d'autant la puissance de l'étude dans la mise en évidence de variations des paramètres de toxicité rénale précoce ;
- La période d'enquête considérée (fin du mois de juin 2004) chevauchant la saison des récoltes, il se peut que les aliments consommés couramment par les personnes interrogées et échantillonnés par elles proviennent de stocks nouvellement constitués en vue de faire la soudure avec un réapprovisionnement imminent ; cette information n'a pas été collectée auprès des personnes enquêtées ; or on se rend actuellement bien compte de la très grande importance des variations saisonnières et des situations particulières : exceptionnellement humides ou exceptionnellement sèches ; ces éléments n'ont pas été considérés dans le choix de la région de Bou Salem comme région de forte exposition.
- Il se peut que la zone d'étude n'ait finalement pas été une zone d'exposition élevée à l'OTA, en dépit des éléments aussi bien hypothétiques qu'objectifs avancés. En effet, dans la mesure où les familles enquêtées n'habitaient la plupart du temps jamais à plus de 20km de la commune de Bou Salem, l'habitat, en fait d'être rural, était le plus souvent périurbain. Ceci pourrait impliquer qu'en dépit de pratiques de stockage domestique des céréales tel que déclaré par les personnes enquêtées, les quantités d'aliments concernées soient faibles (information que nous avons omise de recueillir) et destinées à la seule fabrication d'aliments traditionnels, le reste étant acheté en épicerie au fur et à mesure de l'expression des besoins.
- Les conditions sociales et économiques (niveau d'éducation, chômage, habitat) qui poussent à la constitution de stocks (même modestes), à la mono-consommation d'un type d'aliment et à la consommation d'aliments sans précautions particulières d'hygiène n'ont pas été prises en compte comme facteur d'inclusion en tant que tel.

Des éléments de réponse devraient nous être apportés d'ici peu par le plan de surveillance de la contamination de la diète tunisienne par l'OTA, réalisé sur 2000 échantillons alimentaires prélevés dans les 24 gouvernorats tunisiens au cours de l'année 2004. Un instantané de la variabilité régionale des niveaux de contamination des aliments couramment consommés nous sera alors accessible.

En particulier, nous pourrions considérer l'opportunité de réaliser une seconde étude de la même nature que le pilote de Bou Salem, cette fois-ci dans la région C-O, autour de la commune de Jelma, plus rurale et dans l'ensemble plus pauvre que celle de Bou Salem, et dans laquelle une famille de 21 personnes a récemment été enquêtée, révélant des niveaux

d'exposition à l'OTA très élevés et la présence de NIK chez trois des membres, associée à des types HLA particuliers (HLA B27/35) (Hassen et al. 2004). En effet l'hypothèse d'une composante génétique dans la manifestation des effets néphrotoxiques de l'OTA chez l'homme tend à être confortée par la présence, au sein d'une même famille, de personnes très exposées à l'OTA dont certaines seulement développent une affection rénale.

Par ailleurs, le fait de rajouter dans les critères d'inclusion des pratiques particulières (qualitativement et quantitativement) d'approvisionnement et de stockage du blé semble pertinent dans la mesure où l'objectif est d'identifier un groupe au moins de personnes fortement exposées. En effet, parmi la catégorie des produits à base de blé dur, dont on a vu qu'ils étaient plus largement consommés en zone rurale qu'en zone urbaine, et en particulier dans l'Ouest du pays, la semoule et le couscous industriels ainsi que les pâtes alimentaires représentent à eux seuls respectivement près de 98%, 87% et 93% des dépenses (par personne et par an) dans les régions N-O, C-O et S-O (Institut National de la Statistique 2000b), laissant peu de place au blé dur en grain directement stocké et transformé au niveau du ménage.

En tout état de cause, l'objectif principal de cette étude pilote était de tester la faisabilité de l'étude OTARI en « grandeur nature ». La pertinence et l'efficacité du dispositif de terrain ont effectivement été démontrées.

Cependant il convient d'insister, pour clore la discussion présentée ci-avant, sur l'incertitude autour de l'interprétation de résultats émanant d'un échantillon de petite taille. S'il nous est dans ces circonstances interdit de tirer des conclusions quantitatives quant aux niveaux d'exposition observés dans la zone pilote, il n'en demeure pas moins que cette première phase d'enquête soulève de nombreuses questions. En premier lieu, les caractéristiques alimentaires et sociales associées aux populations réellement susceptibles d'être fortement exposées à l'OTA semblent actuellement échapper au moins en partie à notre entendement, et imposent de reconsidérer avec soin aussi bien les zones d'expositions contrastées que les critères d'inclusion préliminairement définis.

## CONCLUSION GENERALE

<b>I</b>	<b>LES APPORTS DE L'ÉPIDÉMIOLOGIE DANS L'ÉVALUATION DU RISQUE LIÉ À L'OTA</b>	<b>193</b>
<b>I.1</b>	<b>Exposition à l'OTA et pathologie rénale : le cas tunisien</b>	<b>193</b>
I.1.1	L'insuffisance rénale chronique en forte progression	193
	Transition épidémiologique et pathologie rénale	193
	Les néphropathies interstitielles chroniques : une situation endémique ?	193
I.1.2	OTARI : premier bilan et attentes	194
	Le pilote et ses limites	194
	OTARI, c'est fini ?!	195
I.1.3	Une « maladie du désavantage » ?	195
	La transition nutritionnelle, signe d'une régression des expositions ?	195
	Une pathologie pluri-factorielle	196
I.1.4	Les expositions professionnelles	196
<b>I.2</b>	<b>Les écueils méthodologiques de l'évaluation de l'exposition</b>	<b>197</b>
I.2.1	Raffinements populationnels	197
	Variabilité de la contamination alimentaire	197
	Variabilité des ingrédients alimentaires	197
	Le modèle et son modèle	197
I.2.2	Difficultés individuelles	198
	Une variabilité intra-individuelle difficile à stabiliser	198
	Marqueurs biologiques : oui mais...	198
I.2.3	La population française adulte hors de danger	198
<b>I.3</b>	<b>Pour un cadre élargi d'étude des maladies rénales chroniques</b>	<b>199</b>
I.3.1	Les obstacles méthodologiques	199
I.3.2	Vers un « modèle causal »	200
<b>II</b>	<b>LE « PARADOXE DE LA PRECAUTION »</b>	<b>201</b>
<b>II.1</b>	<b>Gestion des risques : normes de sécurité ou normes sécuritaires ?</b>	<b>201</b>
<b>II.2</b>	<b>L'exemple de l'Ochratoxine A</b>	<b>202</b>
II.2.1	Les normes en vigueur	202
II.2.2	Café et Ochratoxine A : protéger qui, et à quel prix ?	203
II.2.3	Un double paradoxe	204

## I LES APPORTS DE L'ÉPIDÉMIOLOGIE DANS L'ÉVALUATION DU RISQUE LIÉ À L'OTA

### I.1 Exposition à l'OTA et pathologie rénale : le cas tunisien

#### I.1.1 L'insuffisance rénale chronique en forte progression

##### Transition épidémiologique et pathologie rénale

Le profil décennal d'incidence de l'IRCT en Tunisie évoque une situation de transition épidémiologique, c'est-à-dire d'une modification de l'importance relative des facteurs de risque et de la force d'incidence des maladies infectieuses et chroniques accompagnant le changement des modes de vie dans les pays en développement, caractérisée notamment par une augmentation forte de la prévalence de l'obésité, du diabète de type 2, de l'hypercholestérolémie et de l'hypertension artérielle. Avec l'âge, le sexe, le tabagisme et des facteurs génétiques, ces affections comptent parmi les facteurs de risque connus les plus importants dans la survenue d'une pathologie rénale chronique.

Entre 1992 et 2001, l'incidence globale de l'IRCT dans la population tunisienne a plus que doublé (+8.6% par an) et atteint des niveaux supérieurs à ceux observés en Europe (167 pmh). Cette évolution peut principalement s'expliquer par le vieillissement de la population tunisienne, une nette amélioration de la prise en charge de l'IRC terminale par traitement de suppléance et une diminution de la force d'incidence des facteurs de risque compétitifs ou de co-morbidité et des complications de l'IRC liés à un meilleur accès aux soins spécialisés. L'augmentation de la force d'incidence des facteurs d'initiation et de progression de l'IRC évoqués plus haut dans un contexte de transition épidémiologique explique également cette rapide augmentation des cas arrivant à un stade où la prise en charge par traitement de suppléance est indispensable.

Conformément à la tendance internationale, les néphropathies diabétiques ont ainsi progressé remarquablement vite au cours de la décennie 90, suivies par les néphropathies interstitielles chroniques, dont les NICI, ce qui constitue une originalité par rapport aux pays développés. Les néphropathies vasculaires et liées à une HTA ont progressé moins rapidement, tandis que les néphropathies glomérulaires et les poly-kystoses rénales sont restées presque stables sur la période.

L'incidence est cependant susceptible d'être sous-estimée en raison des inégalités persistantes d'accès aux soins observées entre régions, chez les plus âgés notamment, ou encore chez les femmes et les personnes en situation de précarité. De plus, l'importance des causes indéterminées rend toute analyse de la force d'incidence par pathologie primaire à l'IRC terminale biaisée. Les variations géographiques observées sont davantage un miroir de l'incidence du traitement de suppléance qu'un reflet fidèle de la fréquence de l'insuffisance rénale terminale dans les populations considérées.

##### Les néphropathies interstitielles chroniques : une situation endémique ?

En dépit des limitations évoquées, nous observons certains particularismes observés en Tunisie et susceptibles d'éclairer qualitativement la problématique Ochratoxine A.

L'importance des NICI parmi les causes NIC et les cas d'IRCT en général, plus marquée chez les femmes que chez les hommes, avec un sexe ratio très bas chez les 45-64 ans, évoque

certaines profils de pathologie primaire de type toxique tels que la NEB et dans le cas présent, la NIKI décrite en introduction comme pouvant être reliée à une exposition chronique à l'OTA.

Nous notons de plus un doublement de l'incidence de l'IRC terminale de cause NIC, et en particulier NICI, entre 1992 et 2001 dans la population tunisienne, qui n'a pas été observé dans la plupart des pays d'Europe. L'impressionnante progression de l'incidence des IRCT de cause indéterminée pourrait de plus en partie s'expliquer par celle des pathologies primaires évoluant à bas bruit, en particulier certaines NIC dont la NIKI décrite en introduction.

Nous relevons enfin des disparités régionales et remarquons en particulier un sexe ratio pour la NIKI très inférieur à un dans la région N-O, pour laquelle l'odds-ratio est supérieur à un. Les odds-ratio positifs pour la NIC et la NIKI relevés dans la région C-E semblent pouvoir provenir au moins en partie de la prise en charge de personnes originaires du C-O où l'accès aux soins spécialisés demeure limité.

Au vu de l'ensemble des informations en notre possession, nous postulons que les cas d'IRCT de cause NIKI recensés sur cette période de 10 ans dans la population tunisienne pourraient en partie être attribuables à une exposition régulière et élevée à l'OTA, sans que nous puissions trancher entre facteur d'initiation et de progression de cette pathologie rénale chronique. Nous limitons toutefois nos extrapolations à certains groupes de populations susceptibles d'être ou d'avoir été fortement exposés à l'OTA et de réunir d'autres facteurs de risque, faisant de la NIC idiopathique une pathologie du « désavantage » (cf. I.1.3). Les personnes recensées ici se trouvant de plus à des stades très avancés d'IRC, nous postulons que les cas possiblement liés à l'OTA renvoient de toute façon à une exposition ancienne ne préjugant pas de la situation actuelle en Tunisie.

La progression observée (doublement de l'incidence des IRCT-NIC y compris les NIKI en 10 ans) pourrait en grande partie s'expliquer par une amélioration de la prise en charge de l'IRC et des facteurs de risque compétitifs. Un grand nombre de cas de NIC est vraisemblablement encore aujourd'hui classé parmi les causes inconnues, ou décède d'une complication avant d'avoir atteint le système de santé.

Enfin, nous pensons qu'il n'est pas exclu que l'OTA soit un facteur de progression pour d'autres pathologies rénales, notamment celles de cause diabétique en forte augmentation dans la population tunisienne et partout dans le monde. Cette hypothèse, soulevée par Hsieh et al. (2004), nécessite pour être testée la mise en place d'études spécifiques.

### I.1.2 OTARI : premier bilan et attentes

#### Le pilote et ses limites

Les résultats de l'étude pilote OTARI n'indiquant ni exposition anormalement élevée de la population enquêtée, ni, de manière cohérente, de manifestations toxiques au niveau rénal pendant la période d'étude, nous interpellent et posent diverses questions. Existe-t-il une tendance globale à la diminution des expositions en Tunisie au cours des deux dernières décennies? Avons-nous plutôt été témoins de la forte variabilité annuelle des niveaux de contamination et d'exposition à l'OTA? Ou encore, les biais inhérents à notre dispositif de terrain nous ont-ils empêchés d'appréhender la réalité?

Notre effectif restreint et le recrutement de plusieurs personnes par ménage a probablement artificiellement réduit la variabilité inter-individuelle des expositions et par la même diminué les chances d'inclure des individus très exposés. De plus, la période d'enquête considérée (fin du mois de juin 2004) chevauchant la saison des récoltes, il se peut que les aliments consommés couramment par les personnes interrogées et échantillonnés par elles proviennent de stocks nouvellement constitués en vue de faire la soudure avec un réapprovisionnement imminent. La zone d'étude pourrait en outre ne pas être à risque particulièrement élevé d'exposition à l'OTA, en dépit des éléments aussi bien hypothétiques qu'objectifs avancés. En effet, dans la mesure où les familles enquêtées n'habitaient la plupart du temps jamais à plus de 20km de la commune de Bou Salem, l'habitat, en fait d'être rural, était le plus souvent périurbain, évoquant des profils d'achat en épicerie au fur et à mesure de l'expression des besoins. Enfin, les conditions sociales et économiques qui poussent à la constitution de stocks, à la mono-consommation d'un type d'aliment et à la consommation d'aliments sans précautions particulières d'hygiène n'ont pas été prises en compte comme facteur d'inclusion en tant que tel.

Des éléments de discussion complémentaires devraient nous être apportés d'ici peu par le plan de surveillance de la contamination de la diète tunisienne par l'OTA, réalisé sur 2000 échantillons alimentaires prélevés dans les 24 gouvernorats tunisiens au cours de l'année 2004. Un instantané de la variabilité régionale des niveaux de contamination des aliments couramment consommés nous sera alors pour la première fois accessible, qui plus est au cours de l'année où le pilote OTARI a été réalisé. Ces résultats interviendront dans le choix d'une éventuelle région de réplique du pilote, et pourront être mis en regard des données du registre des IRCT.

OTARI, c'est fini ?!

La poursuite du protocole OTARI est donc aujourd'hui conditionnelle à :

- la redéfinition des zones géographiques potentiellement fortement, moyennement et faiblement exposées en Tunisie ;
- une application plus stricte des critères d'inclusion des personnes au regard notamment du caractère rural de l'habitat (catégorie « habitat rural dispersé » de l'INS).

Il semble en outre indispensable d'ajouter aux facteurs d'inclusion initialement définis des critères quantitatifs relatifs au stockage domestique des denrées (durée, quantités, conditions de température et d'humidité) et à la faible diversité du régime (en terme de sources d'approvisionnement et de « mono-consommations »). L'étude systématique des facteurs génétiques pressentis (système HLA) semble également pertinente à ce stade de la recherche.

### I.1.3 Une « maladie du désavantage » ?

La transition nutritionnelle, signe probable d'une régression des expositions

Ces deux premières phases d'enquête (registre et OTARI) soulèvent de nombreuses questions, en particulier concernant les caractéristiques alimentaires et sociales associées aux populations réellement susceptibles de présenter une forte exposition à l'OTA plus ou moins reliée à des effets toxiques rénaux, en Tunisie et ailleurs.

En effet, la transition nutritionnelle qui s'opère en Tunisie en rapport avec les changements profonds des styles de vie, notamment l'urbanisation, nous laisse à penser que l'exposition à l'OTA constituerait davantage un problème circonscrit, sinon au passé, à des groupes de populations très exposés et vulnérables sur le plan socio-économique, et éventuellement génétique. Ce problème tendrait ainsi à disparaître avec l'amélioration progressive des conditions matérielles de vie dans la population tunisienne. Et nous serions, pour reprendre une expression dont je n'ai malheureusement pas la maternité, en train d'observer une « étoile éteinte », c'est-à-dire une pathologie du début du siècle dernier.

#### Une pathologie pluri-factorielle

L'OTA pourrait aujourd'hui encore exercer des effets néphrotoxiques chez l'homme dans des conditions d'exposition « extrêmes » et chez des personnes cumulant un certain nombre de facteurs d'initiation et de progression de la pathologie rénale. L'environnement au sens large serait déterminant, avec une prédominance des facteurs socio-économiques, et possiblement une susceptibilité génétique. La NIC associée à l'OTA serait ainsi une pathologie du « désavantage ». La discussion des mesures de gestion du risque actuellement à l'œuvre au niveau international (voir II) fournit à ce titre des éléments d'inquiétude mêlée de colère.

Dans cette hypothèse, des populations essentiellement rurales (issues dans le cas tunisien du N-O ou du C-O, comme le suggèrent les résultats du registre), cumuleraient un certain nombre de facteurs de risque proximaux, dont une exposition chronique et élevée à l'OTA et possiblement à d'autres mycotoxines telles que la citrinine ne serait que l'une des composantes. Cette exposition serait liée à des pratiques telles que l'auto-consommation de céréales, le stockage domestique en conditions favorables au développement des moisissures (chaleur et humidité, absence de traitement fongicide), et la mono-consommation liée à une alimentation peu diversifiée, correspondant à la faiblesse des revenus pouvant y être affectés. Ce dernier point renverrait en outre à des facteurs intermédiaires et distaux d'initiation et de progression de la maladie, en particulier le statut socio-économique, l'obésité, le tabagisme, le sexe, et comme suggéré plus haut, des facteurs génétiques de susceptibilité.

L'importance de la conjonction de facteurs environnementaux et génétiques a été montrée dans des communautés aborigènes particulièrement touchée d'Australie et fournit des pistes de réflexion fécondes (Hoy et al. 2001).

Dans un autre ordre d'idée quoique rejoignant celle des facteurs d'aggravation d'une situation déjà défavorable, chez les personnes dialysées dont l'effectif est en constante augmentation en Tunisie et partout dans le monde, les expositions toxiques sont d'autant plus dangereuses que l'élimination rénale est limitée et cyclique. La question de la sécurité des aliments consommés par ces personnes pourrait donc dans une certaine mesure se poser au même titre que l'adaptation des posologies médicamenteuses.

#### 1.1.4 Les expositions professionnelles

Enfin, une piste alternative rarement prise en compte jusqu'ici serait de concentrer les efforts sur des groupes de population exposés professionnellement en plus de la voie alimentaire ubiquitaire, telles que celles enquêtées en Italie et en Norvège. En Italie, des travailleurs d'usines de transformation du cacao, du café et de différentes épices avaient en effet des concentrations sériques en OTA supérieures à la moyenne dans la population générale. En Norvège, les échantillons de poussières prélevés dans des fermes lors de la manipulation de l'orge et du blé présentaient des niveaux de contamination très variables même si globalement

bas, indiquant de possibles pics d'exposition par inhalation chez les agriculteurs .  
Les doses et les durées d'exposition varient à n'en pas douter d'un contexte à l'autre en fonction de la contamination des denrées manipulées et des conditions de travail (aération du bâtiment et protection des voies respiratoires notamment), donc d'un pays, d'une région et d'une exploitation agricole/entreprise agro-alimentaire à l'autre.

## I.2 Les écueils méthodologiques de l'évaluation de l'exposition

### I.2.1 Raffinements populationnels

#### Variabilité de la contamination alimentaire

Nous avons montré, dans le cas de l'OTA, qu'en plus de la nature non-paramétrique des distributions de contamination, la fenêtre temporelle utilisée pour tirer les valeurs de contamination dans le cadre de la modélisation probabiliste avait une influence considérable sur la variabilité et l'incertitude des paramètres estimés, dimension du modèle jamais prise en compte jusqu'ici. Or une discussion des hypothèses relatives à l'occurrence de la contamination et aux comportements d'achat des consommateurs correspondant aux différentes fenêtres temporelles indique que c'est le tirage au niveau de l'« occasion » de consommation qui serait le plus pertinent dans le cadre de l'évaluation de l'exposition de la population française, la fenêtre « semaine » correspondant davantage à une diète provenant des sources d'approvisionnement peu variées telle qu'on peut l'observer dans des économies rurales et en développement. Nous concluons donc que dans le cas d'une population composant sa diète dans un environnement agro-alimentaire complexe, l'utilisation de distributions non-paramétriques (lorsque la qualité et la quantité des données le permet) et de la fenêtre "occasion" estime au mieux les percentiles élevés d'exposition habituellement comparés aux valeurs toxiques de référence.

#### Variabilité des ingérés alimentaires

Les résultats obtenus sur l'OTA dans la population française indiquent que 3 jours non consécutifs de carnet alimentaire (ou 3 rappels de 24h) combinés à une méthode simplifiée de réduction de la variance empruntée à l'épidémiologie nutritionnelle (décomposition de la variance inter- et intra-individuelle sur un sous-échantillon pour lequel plus de 3 jours sont disponibles) permettent d'augmenter considérablement la précision des estimations aux percentiles élevés dans le cadre d'une modélisation de type déterministe.

#### Le modèle et son modèle

Nos travaux illustrent l'importance de garder en mémoire les caractéristiques des phénomènes étudiés au moment du choix, de la spécification, et de la mise en œuvre du modèle. Modéliser une exposition par des méthodes sophistiquées sans prendre en compte, comme c'est souvent le cas, les facteurs de « process » en particulier, risque fort de conduire à des conclusions erronées. De même, ajuster des lois paramétriques sur des données peu nombreuses risque de surestimer les queues de distribution de contamination, et par la même les percentiles élevés d'exposition.

De nombreuses hypothèses relatives à la réalité « construite » par le modèle sont de plus posées implicitement, hypothèses qu'il est indispensable d'explicitier lors de l'interprétation des résultats. La variabilité des niveaux de contamination à laquelle un individu de la population est exposé en fonction du profil de société de consommation dans lequel il évolue peut à se titre avantageusement être prise en compte dans le modèle par le choix d'une fenêtre

temporelle *ad hoc*. La variabilité court-terme des ingérés alimentaires se surimposant aux tendances sur le long-terme peut également être corrigée par des méthodes appropriées.

### 1.2.2 Difficultés individuelles

#### Une variabilité intra-individuelle difficile à stabiliser

On constate une faiblesse générale des outils de « mesure » des expositions alimentaires toxiques au niveau individuel. Les problèmes rencontrés en épidémiologie nutritionnelle sont doublés de difficultés inhérentes à l'évaluation des contaminations alimentaires, à leur variabilité géographique et temporelle pour ce qui est des produits bruts et finis, et à l'influence du stockage et des processus pour les produits transformés (potentielles différences entre marques notamment).

Transposant les problématiques nutritionnelles à celles des contaminants alimentaires, nous discutons la relation existant entre variabilité intra-individuelle des ingérés, nombre de jours d'enquête, et précision de l'estimation de l'exposition. Nous concluons qu'une approche de type carnet alimentaire ou rappels de 24h ne semble pas réaliste et recommandons l'utilisation de marqueurs biologiques d'exposition à l'OTA, recommandation mise en œuvre dans le cadre du protocole OTARI.

#### Marqueurs biologiques : oui mais...

Depuis une dizaine d'années, l'utilisation de marqueurs biologiques d'exposition, de susceptibilité et d'effets a certes rencontré un certain écho, en épidémiologie professionnelle, environnementale et nutritionnelle notamment, soit comme outils de mesure de l'exposition passée ou présente, soit comme « étalon-or » dans le cadre de la validation d'un autre outil de mesure de l'exposition. Cette approche moléculaire nécessite cependant une importante phase préalable et pluridisciplinaire de développement et de caractérisation avant de pouvoir être appliquée et devrait en tous les cas être replacée dans le cadre de démarches de recherche qualifiées par Pearce (1996) de « top-down » (des populations dans leur contexte vers les molécules aux sites biologiques d'action) à l'opposé d'une vision « bottom-up » par trop réductionniste (McMichael 1999, Pearce 1999).

### 1.2.3 La population française adulte hors de danger

Le modèle probabiliste que nous proposons, alliant distributions non-paramétriques de contamination et tirages au niveau de la fenêtre « occasion », conduit à une probabilité très faible de dépassement de la DJT la plus « protectrice » (SCF 1998), largement inférieure à 1% (9‰). De même, la méthode déterministe de réduction de la variance conduit à une probabilité de dépassement de (8‰) sur la période considérée.

En admettant que ces modèles et les données « source » injectées reflètent la réalité de l'exposition à l'OTA dans la population adulte française, le risque associé à ce contaminant ne peut être considéré comme significatif. Les résultats récemment publiés à partir de l'étude de la diète totale française confirment cette évaluation en rapportant une proportion de dépassement de la DJT dans la population française de 0.9% (Leblanc et al. 2005).

Nous n'avons pas considéré les enfants (personnes âgées de moins de 15 ans) dans cette étude. Leur exposition est la plupart du temps très supérieure à celle des adultes du fait du rapport élevé entre ingérés et poids corporel. Toutefois, il n'existe pas de valeur toxique de référence tenant compte des spécificités enfantines et l'estimation des consommations alimentaires chez l'enfant, réalisée par le biais de l'interview des parents, constitue à lui seul un champ complexe de recherche.

### I.3 Pour un cadre élargi d'étude des maladies rénales chroniques

#### I.3.1 Les obstacles méthodologiques

Les difficultés rencontrées dans la mise en œuvre d'approches épidémiologiques dans l'évaluation du risque lié à l'OTA ne sont pas uniquement imputables à la toxine. Variabilité des niveaux de contamination, problèmes méthodologiques dans l'évaluation de l'exposition, risque supposé faible et manque de puissance des études épidémiologiques dans ce contexte compromettent certes la validité de nombre de travaux.

Toutefois, le type de pathologie auquel l'exposition à l'OTA est suspectée d'être associée, en premier lieu les pathologies rénales chroniques, et en particulier les néphropathies interstitielles chroniques, y est pour beaucoup. Pernegger et coll. pointent en effet la faiblesse des recherches épidémiologiques relatives à l'étiologie des maladies rénales. Il l'attribue dans un premier temps à l'urgence de développer des stratégies de prise en charge chez des personnes dont la qualité de vie est sérieusement affectée (insuffisance rénale chronique) et dont le statut vital est ultimement menacé (insuffisance rénale terminale). Cette urgence thérapeutique a ainsi longtemps éclipsé les démarches orientées vers la compréhension des causes en vue de la mise en place de stratégies de prévention. Aujourd'hui encore, la majeure partie des recherches publiées portent sur la description de la fréquence des pathologies rénales, la plupart du temps au stade de la prise en charge de l'IRCT, ou sur les modalités de cette prise en charge et les risques iatrogènes associés, épidémiologie essentiellement clinique, dont l'intérêt n'est pas à remettre en cause.

Les obstacles méthodologiques sont certes nombreux dans l'étude de l'étiologie des pathologies rénales (Pernegger et al. 1995) :

- encore peu de marqueurs sensibles de l'insuffisance rénale sont disponibles pour les études en population générale ; cette remarque est à nuancer dans le cas spécifique de l'étude de la néphrotoxicité des métaux lourds en situations professionnelles et environnementales ; l'étude CADMIBEL, pour ne citer qu'elle, illustre les succès de l'utilisation de marqueurs d'effets toxiques précoces en population générale (Lauwerys et al. 1990; Bernard et al. 1992; Hotz et al. 1999) ;
- l'inégal accès à la prise en charge par traitement de suppléance introduit de l'incertitude dans l'interprétation des données des registres de l'insuffisance rénale terminale traitée ;
- les causes de décès relatives à une affection rénales sont souvent mal codées sur les certificats de décès, ou du moins de manière différentielle en fonction des personnes établissant le diagnostic ;
- les critères de diagnostic des différentes entités nosologiques rénales sont flous, la définition reposant sur : un agent toxique : « néphropathie au plomb », une cause possible et fréquente d'insuffisance rénale : « néphropathie hypertensive », la coexistence d'une affection systémique : « néphrite liée au lupus », l'apparence histologique du tissu rénal : « néphrite glomérulaire », un mode de transmission : « néphrite héréditaire », un comportement à risque : « néphropathie aux analgésiques », et même une aire géographique : « néphropathie des Balkans ». Les critères de diagnostic ne sont pas toujours exclusifs les uns des autres (peu spécifiques), et les limites entre différentes entités ne sont pas toujours clairement établies. Les diagnostics différentiels sont donc probables et introduisent des erreurs de classification ;
- l'évaluation des facteurs de risque et du type de pathologie ne sont pas indépendantes l'une de l'autre, pouvant conduire à une « vérité circulaire » lorsque la pathologie est pluri-factorielle ;
- l'évaluation de l'exposition est d'autant plus complexe qu'à mesure que la pathologie

rénale progresse, certaines expositions toxiques peuvent augmenter (consommation d'analgésiques et altération de l'élimination rénale) tandis que d'autres diminuent (expositions professionnelles).

Enfin, et ce point nous semble crucial, Pernegger et coll. soulignent l'absence d'un cadre conceptuel global guidant l'interprétation des informations existantes, la sélection des questions de recherche pertinentes, et la mise au point de design d'étude appropriés.

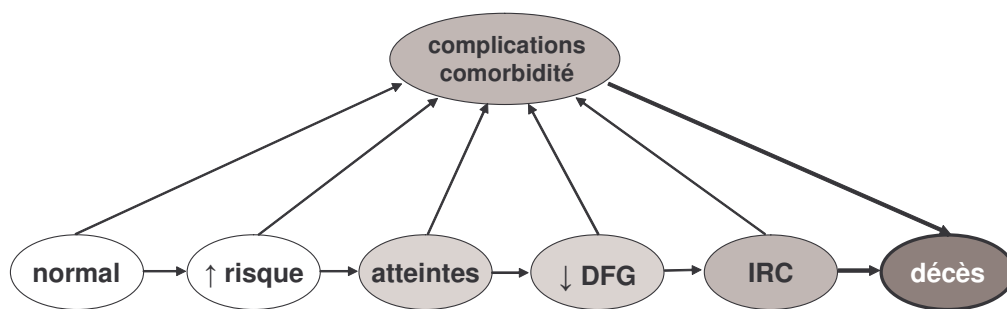
### 1.3.2 Vers un « modèle causal »

Le modèle causal est une représentation simplifiée des causes et des mécanismes qui mènent au phénomène ou à la situation qu'on étudie (Beghin 2002). Il regroupe, dans des chaînes causales, organisées et hiérarchisées, tous les "déterminants" connus ou supposés de cette situation (on utilise de préférence le terme de déterminant pour indiquer un facteur associé au phénomène, sans qu'il soit nécessairement "une cause" de ce dernier). Le modèle causal est donc à la fois une représentation simplifiée d'un phénomène complexe (un vrai "modèle"), un jeu ordonné d'hypothèses sur la causalité du phénomène (le modèle reste valable même si toutes les relations ne sont pas prouvées) et une tentative d'explication. Il est construit en fonction d'un but précis et est donc spécifique à la situation et aux objectifs de l'étude qu'on entreprend. La construction du modèle causal est participative et fait l'objet d'un travail interdisciplinaire.

Le modèle causal a été utilisé pour la première fois dans le diagnostic nutritionnel, et a fait l'objet d'un guide de l'OMS. Il est depuis largement sorti du domaine de la nutrition pour s'appliquer à des programmes et des projets de développement et devenir un des éléments essentiels de l'approche globale et participative de la planification et de l'évaluation.

La construction d'un cadre d'analyse global regroupant les déterminants connus des pathologies rénales et s'inscrivant dans une démarche similaire apporterait à n'en pas douter une base de réflexion solide et structurante pour la recherche étiologique à visée préventive, notamment en matière de pathologie rénale dans la population tunisienne.

Pernegger pose d'ailleurs les bases de la construction d'un tel modèle en préconisant d'explorer en priorité les voies communes de progression d'une pathologie rénale spécifique vers l'insuffisance rénale (cf. figure 1 reproduite du chapitre 1) et de distinguer, chaque fois que cela est possible, les facteurs d'initiation des facteurs de progression, ainsi que leur « proximité » à l'occurrence de la pathologie rénale dans la chaîne causale (continuum depuis les facteurs de risque proximaux propres à l'individu jusqu'aux facteurs distaux partagés par une sous-population).



**Figure 1** : Le continuum des pathologies rénales chroniques : du « normal » au « pathologique » via l'initiation (I) et la progression (P). DFG : débit de filtration glomérulaire. Adapté de K/DOQI 2002.

Au de-là des pistes devant permettre d'aller plus loin dans l'élucidation de l'importance du « risque OTA » en termes de santé publique, le bilan des approches épidémiologiques mises en œuvre jusqu'ici suggère un risque sanitaire pour le moins mineur, tout au plus marginal, en tous les cas circonscrit à des situations particulières qui ne peuvent être prises en compte et prévenues que dans leur contexte propre, et non pas dans le cadre de la réglementation internationale des échanges. Ceci nous amène à sortir de notre cadre d'analyse pour nous interroger sur les mesures de gestion du « risque OTA » actuellement à l'œuvre, qui dans certains cas, à défaut de participer à une réelle démarche d'évitement de la maladie, pourraient présenter des risques autrement plus importants en concourant à la paupérisation de populations déjà fragilisées.

## II LE « PARADOXE DE LA PRECAUTION »

### II.1 Gestion des risques : normes de sécurité ou normes sécuritaires ?

Les mesures de gestion actuellement à l'œuvre dans l'arène du risque alimentaire sont principalement de deux types :

- une réglementation internationale établie dans le cadre des accords SPS et traduite dans les législations nationales ou appliquée comme tel ;
- des recommandations techniques faites aux producteurs du secteur alimentaire afin qu'ils fournissent des produits conformes aux exigences sanitaires édictées.

Nous n'aborderons pas ici les impacts variés de ces normes sur le fonctionnement des marchés dans le cadre du commerce international, vaste sujet qui dépasse largement le cadre de nos compétences et de notre compréhension. Il nous est toutefois apparu au terme de ces travaux de thèse recherchant une meilleure connaissance des effets d'un toxique alimentaire chez l'homme que les mesures adoptées par les États et visant à prévenir certains risques étaient elles-mêmes susceptibles de générer des risques potentiellement autrement plus importants.

La spécificité normative des mesures de gestion du risque alimentaire en situation d'incertitude soulève à nos yeux des questions multiples, notamment quant à sa significativité

en termes de santé publique. Il nous semble que la pertinence et la légitimité des actions de « prévention » (entendue ici comme prévention de l'exposition) devrait plus souvent être mise en regard de ses multiples corollaires, et en premier lieu économiques, parfois lourds de conséquences. Les pays du Sud sont concernés en premier chef, mais pas uniquement, comme en attestent, quoique de manière singulière il est vrai, le nombre de suicides important chez les éleveurs bovins en France suite à la crise de la vache folle (Chemin 2002).

Ces remarques nous conduisent à établir, en forme de question ouverte à la discussion, un parallèle entre prévention et précaution.

À propos de mesures de prévention prises à l'échelle des populations et impliquant une contrainte directe sur les individus, telles que la vaccination contre la diphtérie ou l'obligation de port de la ceinture de sécurité, Rose introduit la notion de « paradoxe de la prévention » : « a preventive measure that brings large benefits to the community offers little to each participating individual » (Rose, 1992). Ce paradoxe réel mais vertueux serait acceptable pour l'individu dans la mesure où il modifie, sous l'impulsion de campagnes d'éducation pour la santé par exemple, son comportement individuel, sans en attendre de « bénéfice santé » personnel palpable. Prenant l'exemple du tabagisme, Rose souligne que les motivations sous-tendant la décision d'arrêter de fumer tiennent plus au renforcement immédiat de l'estime de soi qu'à un réel espoir nourri par le futur-ex-fumeur de diminuer son risque individuel de cancer, dans les quelques années à venir, du moins. Il n'est toutefois pas exclu qu'il fasse partie des quelques personnes pour lesquelles l'événement de santé aura pu être conjuré ou tout au moins remis à plus tard par cette action collective.

Dans le cas du risque alimentaire et de sa « prévention » (au sens de la prévention des expositions), nous parlerons ici par analogie de la possibilité d'un « paradoxe de la précaution », paradoxe néfaste. Qu'entendons-nous par là ? L'évaluation et la gestion du risque alimentaire lié à l'ingestion d'ochratoxine A qui nous a préoccupés tout au long de ces presque 4 années et exactement 200 et 2 pages (jusqu'ici, et c'est bientôt la fin, que ce soit dit) nous servira d'exemple.

## II.2 L'exemple de l'Ochratoxine A

### II.2.1 Les normes en vigueur

En l'état actuel des connaissances qui laissent place à l'incertitude quant à l'existence, chez l'homme, d'une association significative et causale entre l'exposition à l'ochratoxine A et les pathologies chroniques considérées, le principe de précaution est appliqué (nous parlons ici de « précaution » dans la mesure où le lien étiologique n'a pas été établi chez l'homme et que la décision repose sur l'extrapolation de données expérimentales). Des normes sanitaires, nationales et internationales, régissent l'échange des denrées sur ce point en particulier. Le tableau 1 rapporte les normes actuellement en vigueur pour l'ochratoxine A au niveau européen.

Aliment	Norme (µg/kg)
Céréales	5
Produits céréaliers	3
Café torréfié	5
Café soluble	10
Vin	2
Jus de raisin	2
Raisin secs	10

**Tableau 1** : Les normes sanitaires européennes relatives à l'OTA.  
Règlement (CE) n°466/2001 amendé par le règlement (CE) n°123/2005.

D'importantes ressources sont allouées, tant sur le plan de la recherche que des instances publiques de contrôle des denrées destinées à l'alimentation humaine et animale, afin de limiter au maximum les niveaux de contamination.

Le contrôle du respect de ces normes conduit en outre au refus et à la destruction des lots considérés comme trop contaminés. Dans les pays dont l'économie repose essentiellement sur les cultures d'exportation, il s'en suit une perte substantielle de revenus, qui contribue entre autres à n'en pas douter à une fragilisation de l'état de santé des populations.

L'exemple du café nous semble emblématique de ce paradoxe néfaste de la précaution. Rappelons au passage que l'exposition moyenne estimée dans 12 pays d'Europe est faible au regard des valeurs toxicologiques de référence (cf. introduction générale) et que la contribution du café à l'exposition alimentaire à l'OTA dans l'Union Européenne a été estimée à seulement 9% (Miraglia and Brera 2002).

### II.2.2 Café et Ochratoxine A : protéger qui, et à quel prix ?

La vaste majorité (90%) des producteurs qui fournissent 6 millions de tonnes de café chaque année sont de petits cultivateurs travaillant dans des plantations de 0.1 à 5 ha. Cette culture constitue la principale sinon la seule source de revenus de ces familles paysannes, ainsi qu'une importante source de devises étrangères pour les 70 pays où ils vivent et cultivent. Ainsi 25 millions d'agriculteurs dans le monde dépendent, entièrement ou partiellement, de la culture du café. Des millions d'autres gagnent leur vie en transportant et en transformant le café qui se situe au deuxième rang mondial des matières premières agricoles.

La production s'élève à 12 à 15 milliards de dollars par an, dont 45 à 50% reviennent aux cultivateurs. 80% des grains sont exportés vers les pays industrialisés. Une partie revient vers les pays producteurs sous forme lyophilisée ou torréfiée. Les pays producteurs consomment directement le café de basse qualité écarté des circuits d'exportation et dont les quantités sont difficiles à estimer.

Les conséquences possibles pour les pays producteurs des standards OTA adoptés par l'UE sur le café ont été commentés par Duris (2000) dont nous reprenons ici l'argumentaire point par point.

- Perte de parts de marché : elle dépend de la zone géographique, de l'espèce cultivée (arabica ou robusta) et de la méthode de transformation post-récolte (humide ou sèche) qui influencent le risque de contamination ; la norme initialement proposée par l'UE de 3µg/kg aurait pour conséquence d'écarter du marché international 600 à 700 000 t de café, soit l'équivalent de la production de la Côte d'Ivoire, de l'Uganda, de l'Éthiopie, du Guatemala, du Salvador et du Costa Rica réunis, d'après les estimations de l'Institute for

Scientific Information on Coffee (ISIC) ;

- Baisse des prix d'achat aux producteurs : en l'absence d'information sur la distribution régionale des risques de contamination, les transformateurs et exportateurs de café vont probablement être amenés à vouloir minimiser le risque de rejet des lots de café aux portes de l'Europe en achetant à bas prix de petites quantités d'origines variées afin de diluer les contaminations éventuelles ;
- Augmentation de l'exposition à l'OTA des agriculteurs et de la population des pays producteurs : les grains les plus contaminés sont triés par les producteurs eux-mêmes (exposés en première ligne *via* l'auto-consommation) et par les exportateurs (qui gardent une partie des grains de présentation douteuse pour le marché intérieur) ; la population de ces pays consomme donc le café de moins bonne qualité sanitaire en l'absence d'un contrôle national ;
- Diminution de la demande : l'industrie du café pourrait craindre que ses consommateurs tombent en désamour pour le café ;
- Augmentation des prix du café à la vente au détail : en réponse à l'augmentation des standards de qualité occasionnant des coûts de contrôle considérables, une telle augmentation pourrait également freiner la consommation.

On le voit bien, les grands perdants sont les petits producteurs, d'un point de vue micro-économique menaçant directement et quantitativement leurs apports alimentaires (sécurité alimentaire) comme du point de vue de la sécurité sanitaire des aliments composant leur diète (contamination forte par l'OTA chez de forts "auto-consommateurs" de café), évoquant la notion de cumul du désavantage évoquée plus haut.

Il y a, rassurons-nous, aussi de petits profits. "One of life's essentials is wholesome food in adequate amounts. Ensuring this quality is not simple. Hazardous substances contaminate 25% of our limited world food supply. There is an answer. It is X, a world leader in agricultural biotechnology and bioseparations... X's opportunities grow as performance standards tighten and weaker technologies fail." (extrait d'une brochure de communication). Cette firme anonyme vient de développer un test encore plus performant pour détecter l'OTA dans la bière, le café vert et torréfié, le maïs, le mil, le blé et l'alimentation animale. Voilà enfin une bonne nouvelle, réconciliant offre et demande. Et un créneau pour les filières OGM ?

### II.2.3 Un double paradoxe

Nombreux sont les pays pour lesquels l'internationalisation des échanges a conduit à un remplacement progressif de la recherche d'une autosuffisance alimentaire (agriculture vivrière) par la logique du libre-échange (exportation de « cultures de rapport » supposées fournir le revenu nécessaire à l'importation de denrées alimentaires). Outre l'effondrement des cours de ces cultures lié à la concurrence et aux dévaluations engendrées par les ajustements structurels imposés par le Fonds Monétaire International (FMI) et la Banque Mondiale, la non-conformité des lots d'export aux exigences sanitaires fixées par le *CODEX Alimentarius* ou aux normes européennes, souvent plus strictes, proposées par le Scientific Committee for Food, conduit à leur rejet. Bien entendu, les objectifs de ces normes sont louables et leur légitimité incontestable en matière de protection des consommateurs contre falsifications, manipulations abusives ou simplement baisse continue de la qualité des denrées alimentaires destinées à la consommation humaine. Il vise à assurer une circulation plus libre et plus sûre des produits sur le marché mondial.

Cependant, pour certains types de contaminants dont la survenue est difficilement évitable et dont les effets ne sont pas clairement ou pas du tout établis chez l'homme, l'impact des mesures réglementaires prises au nom de la protection de la santé publique nous semble discutable. La question de l'équité (ou plutôt du creusement des inégalités) entre les « pays riches », dont émanent les mesures réglementaires et qui peuvent s'offrir l'arsenal analytique nécessaire à la surveillance de la conformité des denrées, et les « pays pauvres », dont la principale préoccupation est d'assurer une relative sécurité alimentaire, doit être posée.

Le cas des aflatoxines, pourtant les plus toxiques des mycotoxines connues (cancérogènes avérés chez l'homme), est aujourd'hui bien documenté : le JECFA a estimé qu'un abaissement de moitié de la norme actuellement en vigueur (passage de 20 à 10 µg/kg dans l'arachide) permettraient d'éviter 2 cas de cancer primaire du foie par milliard d'habitant dans la population européenne où le virus de l'hépatite B n'est pas endémique (prévalence d'environ 1%). Or Otsuki et al. (2001) ont montré qu'une simple réduction de 10% dans la norme internationale de l'aflatoxine B1 pour l'arachide destinée à la consommation humaine entraînerait une réduction nette de 11% dans les exportations d'arachide de bouche. Les 7 pays d'Europe qui ont adopté en 1998 des normes plus strictes encore que celles préconisées par le JECFA ont occasionné 36% de pertes dans les exportations africaines de cacahuète de table (Otsuki et al. 2001)...

Le "paradoxe de la précaution", paradoxe néfaste par opposition au paradoxe vertueux de la prévention, réside clairement en ceci que pour une à deux vie hypothétiquement gagnées par milliard d'habitants des pays du Nord, des pertes de revenus considérables sont occasionnées pour les pays du Sud dont la sécurité alimentaire dépend largement des exportations vers les pays occidentaux. Ceci, conjugué à une consommation locale et chronique des lots les plus contaminés dont les petits producteurs anticipent le rejet à l'export, a très certainement des conséquences significatives pour ces populations en terme de santé publique, bien qu'il soit relativement plus aisé de mesurer l'effet d'une toxine dans une étude toxicologique expérimentale et d'appliquer mécaniquement une démarche d'évaluation des risques que d'apprécier les conséquences sanitaires dans les pays du Sud de mesures législatives prises au Nord.

Les effets pervers sont donc doubles : d'une part, au nom de la précaution, c'est-à-dire sans savoir si la mesure prise est susceptible d'avoir un quelconque « bénéfice santé », on est prêt à faire courir un risque économique bien réel à des catégories de population dont l'état de santé en dépend largement (directement en termes de sécurité alimentaire et de sécurité des aliments, indirectement *via* les corollaires d'une dégradation des conditions socio-économiques de vie) ; d'autre part, ces mesures imposées par le Nord afin de protéger la santé de consommateurs repus et globalement en bonne santé (même si nous admettons ici faire un énorme raccourci doublé d'une généralisation) pénalisent non seulement les petits producteurs du Sud dont les besoins vitaux sont menacés (sécurité alimentaire notamment) mais plus généralement l'économie de pays déjà considérés comme les moins avancés ou les précédent de près.

Au « Consumer health protection » européen, nous sommes donc tentés d'apposer un « Producer wage depletion » tiers-mondiste.

L'expérience passée prouve que dans de nombreux cas, et notamment en Europe, les législations restrictives quant à la qualité sanitaire des produits importés s'avèrent largement protectionnistes, outils déguisés de défense agressive d'intérêts nationaux (Fontagné et

Mimouni 2001), comme on a même pu le lire dans certains projets de recherche...

Or si le « Dispute Settlement Body » de l'Organisation Mondiale du Commerce mis en place après les négociations de l'Uruguay Round fournit un cadre de règlement des différends à propos des barrières non tarifaires (accords SPS : Sanitary and Phytosanitary Agreement) et techniques (accords TBT : Technical Barriers to Trade Agreement) au commerce, il est probable que la plupart des échanges de balles, à base d'argumentaire scientifique mais le dépassant largement, s'y fasse entre grandes puissances économiques (cf. les démêlés récurrents entre Europe, Etats-Unis et Japon) bien plus souvent qu'entre petits producteurs et gros importateurs.

Et la science dans tout ça?

## Postface

"Le fait que l'on puisse dénoncer le manque ou l'insuffisance [de "culture de santé publique"], mais surtout le fait que les problèmes relatifs à la santé occupent de plus en plus la scène publique et médiatique, au point de redéfinir les rapports entre gouvernants et gouvernés, constituent autant d'indices que nous évoluons désormais bien dans une culture sanitaire. Comme en témoigne le recours au principe de précaution qui, bien au-delà des politiques de prévention adossées aux certitudes de la biomédecine et de l'épidémiologie, met à l'épreuve les capacités de jugement et de décision des gouvernants et de leurs experts dans des situations où le risque sanitaire ne présente qu'une possibilité non scientifiquement démontrée."

[...]

"La culture de santé publique se présente moins comme l'une des composantes centrales d'un grand récit progressiste sur lequel a pu s'établir un large consensus que comme un système de pensée et d'action qui a partie liée avec la puissance et la domination."

[...]

"Que l'on considère le coût prohibitif des anti-rétroviraux dans les pays africains où vivent pourtant la majorité des personnes infectées par le virus du SIDA, le renoncement général au traitement des tuberculoses multirésistantes aux antibiotiques dans les milieux défavorisés ou l'abandon par les firmes pharmaceutiques non seulement de la recherche mais également des molécules elles-mêmes permettant le traitement de certaines endémies touchant des populations non solvables du tiers-monde, on constate qu'en contradiction avec l'invocation d'un droit universel au bien-être, les institutions et les agents de santé publique recourent de fait à des procédures d'évaluation qui fonctionnent selon des échelles de valeur implicitement différenciées entre les hommes. La question de l'accès aux médicaments ne joue d'ailleurs ici que comme le révélateur d'une réalité plus large et plus préoccupante encore, à savoir les disparités des conditions structurelles d'existence qui déterminent, par la médiation de la pauvreté, de la violence, de l'absence d'éducation, et de la précarité au quotidien, des niveaux très éloignés d'espérance de vie."

[...]

"Parmi tous les droits de l'homme dont notre époque est si prolifique, le droit à la santé est sans doute celui qui demeure le plus théorique, lorsque l'on se situe à l'échelle planétaire."

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abarca ML, Bragulat MR, Castella G, Cabanes FJ. 1994. Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. *Appl Environ Microbiol* 60(7):2650-2.
- Abid S, Hassen W, Achour A, Skhiri H, Maaroufi K, Ellouz F, Creppy E, Bacha H. 2003. Ochratoxin A and human chronic nephropathy in Tunisia: is the situation endemic? *Hum Exp Toxicol* 22(2):77-84.
- Abouzied MM, Horvath AD, Podlesny PM, Regina NP, Metodiev VD, Kamenova-Tozeva RM, Niagolova ND, Stein AD, Petropoulos EA, Ganev VS. 2002. Ochratoxin A concentrations in food and feed from a region with Balkan Endemic Nephropathy. *Food Addit Contam* 19(8):755-64.
- Achour A et al. 1993. Néphropathies interstitielles chroniques. Approches cliniques et étiologiques: ochratoxine A. In: Creppy EE, Castegnaro M, Dirheimer G, editors. *Colloques INSERM*; 1993. INSERM John Libbey Eurotext. London. p 227-234.
- Achour A, Bacha H. 2003. Communication personnelle.
- Acra A, Dajani R, Raffoul Z, Karahagopian Y. 1981. Lead-glazed pottery: a potential health hazard in the Middle East. *Lancet* 1(8217):433-4.
- AFSSA, InVS. 2003. Exposition aux dioxines de la population vivant à proximité des UIOM: état des connaissances et protocole d'une étude d'exposition. Available on the internet at: <http://www.afssa.fr/Ftp/Afssa/25506-25507.pdf>.
- Al-Ashban RM, Aslam M, Shah AH. 2004. Kohl (surma): a toxic traditional eye cosmetic study in Saudi Arabia. *Public Health* 118(4):292-8.
- American Diabetes Association. 2001. Clinical practice recommendations 2001: diabetic nephropathy (Position statement). *Diabetes Care* 24(suppl):S69-72.
- Apfelbaum M. 1998. Risques et peurs alimentaires. Odile Jacob. Paris. 288 p.
- Arcella D, Soggiu ME, Leclercq C. 2003. Probabilistic modelling of human exposure to intense sweeteners in Italian teenagers: validation and sensitivity analysis of a probabilistic model including indicators of market share and brand loyalty. *Food Addit Contam* 20 Suppl 1:S73-86.
- Ariwasa, al. e. 1997. Reproducibility of urinary  $\beta$ 2-microglobulin and cadmium excretion among residents in a cadmium-polluted area during a 3-year period. *Toxicology Letters* 91:147-152.
- Arlt VM, Ferluga D, Stiborova M, Pfohl-Leszkowicz A, Vukelic M, Ceovic S, Schmeiser HH, Cosyns JP. 2002. Is aristolochic acid a risk factor for Balkan endemic nephropathy-associated urothelial cancer? *Int J Cancer* 101(5):500-2.
- Armstrong BK, White E, Saracci R. 1992. *Methods of exposure measurement Volume. Principles of exposure measurement in epidemiology*: Oxford University Press. New York. 368 p.
- Assaf H, Betbeder AM, Creppy EE, Pallardy M, Azouri H. 2004. Ochratoxin A levels in human plasma and foods in Lebanon. *Hum Exp Toxicol* 23(10):495-501.
- Austwick PK, Carter RL, Greig JB, Peristianis GC, Smith LP. 1979. Balkan (endemic) nephropathy. *Contrib Nephrol* 16:154-60.
- Babu E, Takeda M, Narikawa S, Kobayashi Y, Enomoto A, Tojo A, Cha SH, Sekine T, Sakthisekaran D, Endou H. 2002. Role of human organic anion transporter 4 in the transport of ochratoxin A. *Biochim Biophys Acta* 1590(1-3):64-75.

- Bacha H, Haddidane R, Creppy E, Regnault C, Ellouze F, Dirheimer G. 1988. Monitoring and identification of fungal toxins in food products, animal feed and cereals in Tunisia. *Journal of Stored Products Research* 24(4):199-206.
- Bacha H, Maaroufi K, Achour A, Hamammi M, Ellouz F, Creppy E. 1993. Ochratoxines et ochratoxicoses humaines en Tunisie. In: Creppy EE, Castegnaro M, Dirheimer G, editors. *Colloques INSERM; 1993. INSERM John Libbey Eurotext*. p 111-121.
- Bakker M., Pieters M.N. 2002. Risk assessment of Ochratoxin A in the Netherlands. Bilthoven: Inspectorate for Health Protection and Veterinary Public Health.
- Ball S, Lloyd J, Cairns T, Cook T, Palmer A, Cattell V, Taube D. 2001. Why is there so much end-stage renal failure of undetermined cause in UK Indo-Asians? *Qjm* 94(4):187-93.
- Barsoum RS. 2002a. Overview: end-stage renal disease in the developing world. *Artif Organs* 26(9):737-46.
- Barsoum RS. 2002b. End-stage renal disease in the developing world. *Artif Organs* 26(9):735-6.
- Barsoum RS. 2003. End-stage renal disease in North Africa. *Kidney Int Suppl*(83):S111-4.
- Bartels H, Bohmer M. 1971. Micro-determination of creatinine. *Clin Chim Acta* 32(1):81-5.
- Basiotis PP, Welsh SO, Cronin FJ, Kelsay JL, Mertz W. 1987. Number of days of food intake records required to estimate individual and group nutrient intakes with defined confidence. *J Nutr* 117(9):1638-41.
- Baudrimont I, Sostaric B, Yenot C, Betbeder AM, Dano-Djedje S, Sanni A, Steyn PS, Creppy EE. 2001. Aspartame prevents the karyomegaly induced by ochratoxin A in rat kidney. *Arch Toxicol* 75(3):176-83.
- Beaton GH, Milner J, Corey P, McGuire V, Cousins M, Stewart E, de Ramos M, Hewitt D, Grambsch PV, Kassim N and others. 1979. Sources of variance in 24-hour dietary recall data: implications for nutrition study design and interpretation. *Am J Clin Nutr* 32(12):2546-9.
- Beghin I. 2002. Le modèle causal dans la surveillance nutritionnelle. *Options Méditerranéennes, Série B*. 41:29-37.
- Belgaied JE. 2003. Release of heavy metals from Tunisian traditional earthenware. *Food Chem Toxicol* 41(1):95-8.
- Belhaj AM. 2002. Insuffisance rénale chronique du sujet âgé (à propos de 200 cas). Monastir: Université du Centre, Faculté de Médecine de Monastir.
- Beltaifa L, Ben Alaya N, Gaigi S, Delpeuch F. 2002. Le modèle causal Obésité en Tunisie. *Options Méditerranéennes, Série B* 41:71-93.
- Ben Alaya N, Delpeuch F, Ben Romdhane H. 2002. Le modèle causal des cardiopathies ischémiques en Tunisie. *Options Méditerranéennes, Série B* 41:95-118.
- Ben Romdhane H, Khaldi R, Oueslati A, Skhiri H. 2002. Transition épidémiologique et transition alimentaire et nutritionnelle en Tunisie. *CIHEAM - Options Méditerranéennes, Série B* 41:7-27.
- Ben Romdhane H. 2001. Les cardiopathies ischémiques, l'épidémie et ses déterminants - Volume 1: Les facteurs de risque. In: Institut National de la Santé Publique, editor. p 317.
- Ben Salem M, Daaloul A, Ayadi A. 1994. Le blé dur en Tunisie. *CIHEAM - Options Méditerranéennes*:81-91.
- Bernard A, Lauwerys R. 1989. Epidemiological application of early markers of nephrotoxicity. *Toxicol Lett* 46(1-3):293-306.
- Bernard A, Lauwerys RR. 1991. Proteinuria: changes and mechanisms in toxic nephropathies. *Crit Rev Toxicol* 21(5):373-405.

- Bernard A, Roels, H, Thielemans, N, Van Lierde, M, Lauwerys, R. Assessment of the causality of the cadmium-protein relationships in the urine of the general population with reference to the Cadmibel study. 1992. IARC Scientific Publication, Lyon. 118:341-46.
- Bernard A, Stolte H, de Broe E, Mueller PW, Mason HJ, Lash LH, Fowler BA. 1997. Urinary biomarkers to detect significant effects of environmental and occupational exposure to nephrotoxins. IV. Current information on interpreting the health implications of tests. *Renal Failure* 19(4):553-566.
- Berndt WO, Hayes AW, Phillips RD. 1980. Effects of mycotoxins on renal function: mycotoxic nephropathy. *Kidney Int* 18(5):656-64.
- Bhandari S, Kalowski S, Collett P, Cooke BE, Kerr P, Newland R, Dowling J, Horvath J. 2002. Karyomegalic nephropathy: an uncommon cause of progressive renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 17(11):1914-20.
- Bianchi S, Bigazzi R, Campese VM. 1999. Microalbuminuria in essential hypertension: significance, pathophysiology, and therapeutic implications. *Am J Kidney Dis* 34(6):973-95.
- Bingham SA, Luben R, Welch A, Wareham N, Khaw KT, Day N. 2003. Are imprecise methods obscuring a relation between fat and breast cancer? *Lancet* 362(9379):212-4.
- BIT/Chaabane M. 2003. Vers l'universalisation de la sécurité sociale: l'expérience de la Tunisie. Document n°4. Genève.
- Black AE, Cole TJ. 2001. Biased over- or under-reporting is characteristic of individuals whether over time or by different assessment methods. *J Am Diet Assoc* 101(1):70-80.
- Boege F. 1998. 12.6 Urinary Proteins. In: Thomas L, editor. *Clinical Laboratory Diagnostics*. Frankfurt: TH Books Verlagsgesellschaft. p 362-366.
- Boorman GA, McDonald MR, Imoto S, Persing R. 1992. Renal lesions induced by ochratoxin A exposure in the F344 rat. *Toxicol Pathol* 20(2):236-45.
- Bosch FX, Peers F. 1991. Aflatoxins: data on human carcinogenic risk. *IARC Sci Publ*(105):48-53.
- Bosch F.X, Ribes J, Diaz M, and Cleries R. 2004. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. *Gastroenterology* 127:S5-S16.
- Bouyer J, Hémon D, Cordier S, Derriennic F, Stücker I, Stengel B, Clavel J. 1995. *Epidémiologie: principes et méthodes quantitatives*. Editions INSERM. Paris. 498 p.
- Bouyer J. 1996. Puissance d'un test statistique. In: ESTEM, editor. *Méthodes Statistiques Médecine-Biologie*: INSERM. Paris.
- Box G.E.P., Cox D.R. 1964. An analysis of transformations. *Journal of the Royal Statistical Society Series B* 26:211-252.
- Bozic Z, Duancic V, Belicza M, Kraus O, Skljarov I. 1995. Balkan endemic nephropathy: still a mysterious disease. *Eur J Epidemiol* 11(2):235-8.
- 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(2):183-92.
- Brera C, Miraglia M. 1996. Quality Assurance in Mycotoxin Analysis. *Microchem J* 54(4):465-71.
- Bullerman LB, Ryu D, Jackson LS. 2002. Stability of fumonisins in food processing. *Adv Exp Med Biol* 504:195-204.
- Burchardt K, Jung K. 1992. Physiological factors influencing enzyme excretion. In: Jung K, Mattenheimer H, Burchardt K, editors. *Urinary Enzymes in Clinical and Experimental Medicine*. Springer-Verlag. Berlin. p 73-86.

- Burry AF. 1974. Extreme dysplasia in renal epithelium of a young woman dying from hepatocarcinoma. *J Pathol* 113(3):147-50.
- Buzzard M. 1998. 24-hour dietary recall and food record methods. In: Willett W., editor. *Nutritional Epidemiology*, 2nd edn. Oxford University Press. New York. p 50-73.
- Byrne C, Nedelman J, Luke RG. 1994. Race, socioeconomic status, and the development of end-stage renal disease. *Am J Kidney Dis* 23(1):16-22.
- Calamassi-Tran G. 2004. Présentation de RECIPE: base de recettes de la nomenclature INCA. Document de travail AFSSA.
- Calderon RL. 2000. Measuring risks in humans: the promise and practice of epidemiology. *Food Chem Toxicol* 38(1 Suppl):S59-63.
- Canadian Organ Replacement Register. 2001. 2001 Report, Volume 1: Dialysis and renal transplantation. Ottawa,
- Cárcamo J., Ocio Armentia J.A. 2001. Influence of pesticide residue data input presentation on the output of stochastic models. The Monte-Carlo Project. Report on Workpackage 2. Gobierno Vasco. Dirección de salud pública, Vitoria-Gasteiz. Spain. Available online at: <[http://www.tchpc.tcd.ie/montecarlo/reports/pdf/p7\\_WP2\\_report1.pdf](http://www.tchpc.tcd.ie/montecarlo/reports/pdf/p7_WP2_report1.pdf)>.
- Carlin F, Girardin H, Peck MW, Stringer SC, Barker GC, Martinez A, Fernandez A, Fernandez P, Waites WM, Movahedi S and others. 2000. Research on factors allowing a risk assessment of spore-forming pathogenic bacteria in cooked chilled foods containing vegetables: a FAIR collaborative project. *Int J Food Microbiol* 60(2-3):117-35.
- Carriquiry AL. 2003. Estimation of usual intake distributions of nutrients and foods. *J Nutr* 133(2):601S-8S.
- Cass A, Cunningham J, Snelling P, Wang Z, Hoy W. 2004. Exploring the pathways leading from disadvantage to end-stage renal disease for indigenous Australians. *Soc Sci Med* 58(4):767-85.
- Cassidy CM. 1994. Walk a mile in my shoes: culturally sensitive food-habit research. *Am J Clin Nutr* 59(1 Suppl):190S-197S.
- Castegnaro M, Maru V, Petkova-Bocharova T, Nikolov I, Bartsch H. 1991. Concentrations of ochratoxin A in the urine of endemic nephropathy patients and controls in Bulgaria: lack of detection of 4-hydroxyochratoxin A. In: Castegnaro M, Plestina R, Dirheimer G, Chernozemsky IN, Bartsch H, editors. *Mycotoxins Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours*. IARC. Lyon. p 165-169.
- Ceovic S, Hrabar A, Radonic M. 1985. An etiological approach to Balkan endemic nephropathy based on the investigation of two genetically different populations. *Nephron* 40(2):175-9.
- Ceovic S, Hrabar A, Saric M. 1992. Epidemiology of Balkan endemic nephropathy. *Food Chem Toxicol* 30(3):183-8.
- Chardon O., Dumartin S. 1998. Fidélité aux enseignes, fidélité aux marques: les choix des consommateurs. *INSEE Première* 609.
- Chemin A. (2002) L'augmentation des suicides exprime la détresse des paysans. *Le Monde* 26 octobre 2002.
- Cherif M, Essoussi K. L'extension de la sécurité sociale aux populations non couvertes - Rapport de la Tunisie. In: Association Internationale de la Sécurité Sociale, editor; 2004; Limbé, Cameroun.
- Chernozemsky IN, Petkova-Bocharova T, Nikolov IG, Stoyanov IS. 1978. Familial aggregation of urinary system tumors in a region with endemic nephropathy. *Cancer Res* 38(4):965-8.
- Cheung CK, Lao T, Swaminathan R. 1989. Urinary excretion of some proteins and enzymes during normal pregnancy. *Clin Chem* 35(9):1978-80.

- Chevassus-au-Louis B. L'analyse du risque alimentaire: quels principes, quels modèles, quelles organisations pour demain? In: Hanak E., Boutrif E., Fabre P., M. P, editors; 2001; Montpellier. CIRAD.
- Clavel-Chapelon F. 1997. E3N, a French cohort study on cancer risk factors. *European Journal of Cancer Prevention* 6:473-478.
- Cockroft DW, Gault MH. 1976. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron* 16:31-41.
- Codex Alimentarius Commission. 2000. Proposed draft code of practice for the prevention of contamination by ochratoxin A in cereals. Beijing, People's Republic of China: Joint FAO/WHO Food Standards Programme.
- Coggon D, Friesen MD. 1997. Markers of internal dose: chemical agents. *IARC Sci Publ*(142):95-101.
- Cohen J. 1960. A coefficient of agreement for nominal scales. *Educational and Psychological Measurements* 20:37-46.
- Cohen J. 1968. Weighted kappa: nominal scale agreement with provision for scaled disagreement or partial credit. *Psychological Bulletin* 70:213-220.
- Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France (CSHPF) 1999. 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 ; coordonnatrice, A. Pfohl-Leszkowicz. Tec & Doc. Paris. 478p.
- Counil É., Verger P., Volatier J.L. 2005a. Handling of contamination variability in exposure assessment: A case-study with Ochratoxin A. *Food and Chemical Toxicology* 43:1541-1555.
- Counil É., Verger P., Volatier J.L. 2005b. Fitness-for-purpose of dietary survey duration: A case-study with the assessment of exposure to Ochratoxin A. InPress.
- Cox DR, Snell EJ. 1989. *The Analysis of Binary Data*, Second Edition. Chapman and Hall, editor. London.
- Creppy E, Castegnaro M, Grosse Y, Mériaux J, Manier C, Moncharmont P, Waller C. 1993. Etude de l'ochratoxicose humaine dans trois régions de France: Alsace, Aquitaine et région Rhône-Alpes. In: Creppy E, Castegnaro M, Dirheimer G, editors; 1993. INSERM/John Libbey Eurotext. p 147-158.
- Creppy EE. 2002. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicol Lett* 127(1-3):19-28.
- Cullen A.C., Frey H.C. 1999. Probabilistic techniques for exposure assessment: a handbook for dealing with variability and uncertainty in models and inputs. Plenum Press. New York. 352 p.
- Cvoriscec D, Ceovic S, Borso G, Rukavina AS. 1998. Endemic nephropathy in Croatia. *Clin Chem Lab Med* 36(5):271-7.
- Dahlmann A, Dantzler WH, 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. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 286(1):157-162.
- Daures JP, Gerber M, Scali J, Astre C, Bonifacj C, Kaaks R. 2000. Validation of a food-frequency questionnaire using multiple-day records and biochemical markers: application of the triads method. *J Epidemiol Biostat* 5(2):109-15.
- Davidson PW, Myers GJ, Cox C, Axtell C, Shamlaye C, Sloane-Reeves J, Cernichiari E, Needham L, Choi A, Wang Y and others. 1998. Effects of prenatal and postnatal methylmercury exposure from fish consumption on neurodevelopment: outcomes at 66 months of age in the Seychelles Child Development Study. *JAMA* 280(8):701-7.
- Di Paolo N, Guarnieri A, Loi F, Sacchi G, Mangiarotti AM, Di Paolo M. 1993. Acute renal failure from inhalation of mycotoxins. *Nephron* 64(4):621-5.

- Dirheimer G, Creppy EE. 1991. Mechanism of action of ochratoxin A. Lyon. IARC Sci Publ 115:171-86.
- Disney A. 1995. Demography and survival of patients receiving treatment for chronic renal failure in Australia and New Zealand: report on dialysis and renal transplantation treatment from the Australia and New Zealand dialysis and transplant registry. *American Journal of Kidney Disease* 25(1):165-175.
- Disney A. 1998. Some trends in chronic renal replacement therapy in Australia and New Zealand, 1997. *Nephrology, Dialysis, Transplantation* 13(4):854-859.
- Djokic M, Hadzi-Djokic J, Nikolic J, Dragicevic D, Radivojevic D. 1999. Comparison of upper urinary tract tumors in the region of Balkan nephropathy with those of other regions of Yugoslavia. *Prog Urol* 9(1):61-8.
- Doll R. 1981. Relevance of epidemiology to policies for the prevention of cancer. *J Occup Med* 23(9):601-9.
- Doll R. 1996. Weak associations in epidemiology: importance, detection, and interpretation. *Journal of Epidemiology* 6(4):S11-S20.
- Dorne JL, Walton K, Renwick AG. 2004. Human variability in the renal elimination of foreign compounds and renal excretion-related uncertainty factors for risk assessment. *Food Chem Toxicol* 42(2):275-98.
- Drasgow F. 1988. Polychoric and polyserial correlations. In: Kotz L., Johnson N.L., editors. *Encyclopedia of statistical sciences*. New-York: Wiley. p 69-74.
- Drewnowski A, Henderson SA, Driscoll A, Rolls BJ. 1997. The Dietary Variety Score: assessing diet quality in healthy young and older adults. *J Am Diet Assoc* 97(3):266-71.
- Dubrey et al. 1997. Increased urinary albumin and retinol-binding protein in type I diabetes. A study of identical twins. *Diabetes Care* 20(1):84-89.
- Duris D. 2000. Coffee and ochratoxin contamination. Food Safety Management in Developing Countries. Proceedings of the International Workshop, CIRAD-FAO, 11-13 December 2000, Montpellier, France.
- Dyer AR, Greenland P, Elliott P, Daviglius ML, Claeys G, Kesteloot H, Ueshima H, Stamler J. 2004. Evaluation of measures of urinary albumin excretion in epidemiologic studies. *Am J Epidemiol* 160(11):1122-31.
- Eko-Ebongue S, Antalick JP, Bonini M, Betbeder AM, Faugère JG, Maaroufi K, Bacha H, Achour A, Grosse Y, Pfohl-Leskowicz A and others. 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. *Annales de falsifications, de l'expertise chimique et toxicologique* 87(929):213-223.
- Elling F, Moller T. 1973. Mycotoxic nephropathy in pigs. *Bull World Health Organ* 49(4):411-8.
- Entwisle AC, Williams AC, Mann PJ, Slack PT, Gilbert J. 2000. Liquid chromatographic method with immunoaffinity column cleanup for determination of ochratoxin A in barley: collaborative study. *J AOAC Int* 83(6):1377-83.
- ERA-EDTA Registry. 2004. ERA-EDTA Registry 2002 Annual Report. Amsterdam, The Netherlands.
- European Addiction Research. 2001. Alcohol per capita Consumption, Patterns of Drinking and Abstinence Worldwide after 1995. *European Addiction Research* 7:155-157.
- Eurostat. 1997. Statistiques démographiques 1997. Luxembourg.
- Eymard I. 1999. De la grande surface au marché: à chacun ses habitudes. INSEE Première 636.
- Fakhfakh R, Hsairi M, Maalej M, Achour N, Nacet T. 2002. Tobacco use in Tunisia: behaviour and awareness. *Bulletin of the World Health Organization* 80(5):350-356.
- Fan X., Felsovalyi Á., Sivo S.A., Keenan S.C. 2002. SAS® for Monte Carlo Studies: A Guide to Quantitative Researchers. Cary, NC, USA: SAS Institute Inc. 252 p.

- Faul F, Erdfelder E. 1992. GPOWER: a priori, post-hoc and compromise power analyses for MS-DOS (computer program). Free application. In: FRG: Bonn University DoP, editor. Bonn.
- Fazekas B, Tar A, Kovacs M. 2005. Ochratoxin a content of urine samples of healthy humans in Hungary. *Acta Vet Hung* 53(1):35-44.
- Feest T, Rajamahesh J, Byrne C, Ahmad A, Ansell D, Burden R, Roderick P. 2005. Trends in adult renal replacement therapy in the UK: 1982-2002. *QJM* 98(1):21-28.
- Ferrari P, Kaaks R, Riboli E. 2000. Variance and confidence limits in validation studies based on comparison between three different types of measurements. *J Epidemiol Biostat* 5(5):303-13.
- Filali A, Betbeder AM, Baudrimont I, Benayad A, Soulaymani R, Creppy EE. 2002. Ochratoxin A in human plasma in Morocco: a preliminary survey. *Human and Experimental Toxicology* 21(5):241-245.
- Fleiss J.L. 1981. *Statistical methods for rates and proportions*. Second Edition. New York: John Wiley & Sons, Inc. 321 p.
- Fliser D, Franek E, Ritz E. 1997. Renal function in the elderly - is the dogma of an inexorable decline of renal function correct? *Nephrology, Dialysis, Transplantation* 12:1553-1555.
- Fontagné L., Mimouni M. 2001. L'environnement, nouvel obstacle au commerce de produits agricoles et alimentaires. *Economie Internationale* 87: 63-87.
- Freudenheim JL, Johnson NE, Wardrop RL. 1987. Misclassification of nutrient intake of individuals and groups using one-, two-, three-, and seven-day food records. *Am J Epidemiol* 126(4):703-13.
- Frohlich AA, Marquardt RR, Bernatsky A. 1988. Quantitation of ochratoxin A: use of reverse phase thin-layer chromatography for sample cleanup followed by liquid chromatography or direct fluorescence measurement. *J Assoc Off Anal Chem* 71(5):949-53.
- Frohlich AA, Marquardt RR, Ominski KH. 1991. Ochratoxin A as a contaminant in the human food chain: a Canadian perspective. *IARC Sci Publ*(115):139-43.
- Fuchs, al. e. 1988. Entero-hepatic circulation of ochratoxin A in rats. *Periodicum Biologorum* 90:39-42.
- Fuchs R, Radic B, Ceovic S, Sostaric B, Hult K. 1991. Human exposure to ochratoxin A. Lyon. *IARC Sci Publ* 115:131-4.
- Galtier P, Charpentreau JL, Alvinerie M, Labouche C. 1979. The pharmacokinetic profile of ochratoxin A in the rat after oral and intravenous administration. *Drug Metabolism and Disposition* 7:429-434.
- Galtier P. 1991. Pharmacokinetics of ochratoxin A in animals. In: Castegnaro M, Plestina R, Dirheimer G, Chernozemsky IN, Bartsch H, editors. *Mycotoxins Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours.*: IARC Lyon. p 187-200.
- Gauchi JP, Leblanc JC. 2002. Quantitative assessment of exposure to the mycotoxin Ochratoxin A in food. *Risk Anal* 22(2):219-34.
- Gay C. 2000. Estimation of population distributions of habitual nutrient intake based on a short-run weighed food diary. *Br J Nutr* 83(3):287-93.
- Gekle M, Sildernagl S. 1994. The role of the proximal tubule in ochratoxin A nephrotoxicity in vivo: toxicodynamics and toxico-kinetic aspects. *Renal Physiology and Biochemistry* 17:40-49.
- Gekle M, Sildernagl S. 1996. Renal toxicodynamics of ochratoxin A: a patho-physiological approach. *Kidney Blood Pressure Research* 19(5):225-235.
- Gekle M, Sauvant C, Schwerdt G, Silbernagl S. 1998. Tubulotoxic mechanisms of ochratoxin A. *Kidney Blood Press Res* 21(2-4):277-9.

Gekle M, Sauvant C, Schwerdt G. 2005. Ochratoxin A at nanomolar concentrations: a signal modulator in renal cells. *Mol Nutr Food Res* 49(2):118-30.

GEMS/FOOD-Euro. Second workshop on reliable evaluation of low-level contamination of food, 26-27 May 1995; Kulmbach Federal Republic of Germany.

Gibney MJ, van der Voet H. 2003. Introduction to the Monte Carlo project and the approach to the validation of probabilistic models of dietary exposure to selected food chemicals. *Food Addit Contam* 20 Suppl 1:S1-7.

Gilbert J, Brereton P, MacDonald S. 2001. Assessment of dietary exposure to Ochratoxin A in the UK using a duplicate diet approach and analysis of urine and plasma samples. *Food Additives and Contaminants* 18(12):1088-1093.

Gilbert J, Ankam E. 2002. Validation of analytical methods for determining mycotoxins in foodstuffs. *Trends in analytical chemistry* 21(6-7):468-486.

Godin M, Fillastre JP, Simon P, Francois A, Roy FL, Morin JP. 1997. Is ochratoxin a nephrotoxic in human beings? *Adv Nephrol Necker Hosp* 26:181-206.

Goldberg GR, Black AE, Jebb SA, Cole TJ, Murgatroyd PR, Coward WA, Prentice AM. 1991. Critical evaluation of energy intake data using fundamental principles of energy physiology: 1. Derivation of cut-off limits to identify under-recording. *Eur J Clin Nutr* 45(12):569-81.

Golinski P, Grabarkiewicz-Szczesna J, Chelkowski J, Hult K, Kostecki M. 1991. Possible sources of ochratoxin A in human blood in Poland. *IARC Sci Publ*(115):153-8.

Gong YY, Cardwell K, Hounsa A, Egal S, Turner PC, Hall AJ, Wild CP. 2002. Dietary aflatoxin exposure and impaired growth in young children from Benin and Togo: cross sectional study. *Bmj* 325(7354):20-1.

Gonzalez de Mejia E, Craigmill AL. 1996. Transfer of lead from lead-glazed ceramics to food. *Arch Environ Contam Toxicol* 31(4):581-4.

Grandjean P, Weihe P, White RF, Debes F, Araki S, Yokoyama K, Murata K, Sorensen N, Dahl R, Jorgensen PJ. 1997. Cognitive deficit in 7-year-old children with prenatal exposure to methylmercury. *Neurotoxicol Teratol* 19(6):417-28.

Greenfield H., Southgate D.A.T. 1992. *Food Composition Data: Production, Management and Use*. London: Elsevier Applied Science/Chapman and Hall. 243 p.

Groopman JD, Wild CP, Hasler J, Junshi C, Wogan GN, Kensler TW. 1993. Molecular epidemiology of aflatoxin exposures: validation of aflatoxin-N7-guanine levels in urine as a biomarker in experimental rat models and humans. *Environ Health Perspect* 99:107-13.

Groopman JD, Wang JS, Scholl P. 1996. Molecular biomarkers for aflatoxins: from adducts to gene mutations to human liver cancer. *Can J Physiol Pharmacol* 74(2):203-9.

Groopman JD, Kensler TW. 1999. The light at the end of the tunnel for chemical-specific biomarkers: daylight or headlight? *Carcinogenesis* 20(1):1-11.

Grosso F, Said S, Mabrouk I, Freymy JM, Castegnaro M, Jemmali M, Dragacci S. 2003. New data on the occurrence of ochratoxin A in human sera from patients affected or not by renal diseases in Tunisia. *Food and Chemical Toxicology* 41(8):1133-1140.

Grunwald GK, Sullivan DK, Hise M, Donnelly JE, Jacobsen DJ, Johnson SL, Hill JO. 2003. Number of days, number of subjects, and sources of variation in longitudinal intervention or crossover feeding trials with multiple days of measurement. *Br J Nutr* 90(6):1087-95.

Guenther PM, Kott PS, Carriquiry AL. 1997. Development of an approach for estimating usual nutrient intake distributions at the population level. *J Nutr* 127(6):1106-12.

- Guy JM, McMurray JR. 1993. Urinary Retinol Binding Protein: stability and pre-analytical handling of specimens for its measurement. *Annals of Clinical Biochemistry* 30(1):77-82.
- Hadidane et al. 1985. Correlation between alimentary mycotoxin contamination and specific diseases. *Colloques INSERM*; 1985. p 491-501.
- Hadidane R, Bacha H, Creppy EE, Hammami M, Ellouze F, Dirheimer G. 1992. Isolation and structure determination of natural analogues of the mycotoxin ochratoxin A produced by *Aspergillus ochraceus*. *Toxicology* 76(3):233-43.
- Hagelberg S, Hult K, Fuchs R. 1989. Toxicokinetics of ochratoxin A in several species and its plasma-binding properties. *Journal of Applied Toxicology* 9(2):91-96.
- Hald B. 1991. Ochratoxin A in human blood in European countries. In: Castegnaro M, Plestina R, Dirheimer G, Chernozemsky IN, Bartsch H, editors. *Mycotoxins Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours*.: IARC. Lyon. p 159-164.
- Hald B. 1991. Porcine nephropathy in Europe. *IARC Sci Publ*(115):49-56.
- Halstensen AS, Nordby KC, Elen O, Eduard W. 2004. Ochratoxin A in grain dust--estimated exposure and relations to agricultural practices in grain production. *Ann Agric Environ Med* 11(2):245-54.
- Hannedouche T. 1999. Sémiologie: Bandelettes Urinaires. Page internet du site Nephrohus e-learning: <[http://www.nephrohus.org/uz/article.php3?id\\_article=22](http://www.nephrohus.org/uz/article.php3?id_article=22)>.
- Hassen W, Abid S, Achour A, Creppy E, Bacha H. 2004. Ochratoxin A and beta2-microglobulinuria in healthy individuals and in chronic interstitial nephropathy patients in the centre of Tunisia: a hot spot of Ochratoxin A exposure. *Toxicology* 199(2-3):185-93.
- Hassen W, Abid-Essafi S, Achour A, Guezzah N, Zakhama A, Ellouz F, Creppy E, Bacha H. 2004. Karyomegaly of tubular kidney cells in human chronic interstitial nephropathy in Tunisia: respective role of Ochratoxin A and possible genetic predisposition. *Human and Experimental Toxicology* 23(7):339-346.
- Hertz-Picciotto I. 1995. Epidemiology and quantitative risk assessment: a bridge from science to policy. *Am J Public Health* 85(4):484-91.
- Heaney RP, Davies KM, Recker RR, Packard PT. 1990. Long-term consistency of nutrient intakes in humans. *J Nutr* 120(8):869-75.
- Hellstrom L, Elinder CG, Dahlberg B, Lundberg M, Jarup L, Persson B, Axelson O. 2001. Cadmium exposure and end-stage renal disease. *Am J Kidney Dis* 38(5):1001-8.
- Hercberg S., Deheeger M., Preziosi P. 1994. SU.VI.MAX: Portions alimentaires. Manuel photos pour l'estimation des quantités. Paris.: Ed. Su.Vi.Max.-Candia-Polytechnica. 120 p.
- Hercberg S, Preziosi P, Briancon S, Galan P, Triol I, Malvy D, Roussel AM, Favier A. 1998. A primary prevention trial using nutritional doses of antioxidant vitamins and minerals in cardiovascular diseases and cancers in a general population: the SU.VI.MAX study--design, methods, and participant characteristics. *Supplementation en Vitamines et Minéraux Antioxydants. Control Clin Trials* 19(4):336-51.
- Hill RJ, Davies PS. 2001. The validity of self-reported energy intake as determined using the doubly labelled water technique. *Br J Nutr* 85(4):415-30.
- Hirsch M. 2002. *Ces peurs qui nous gouvernent. Sécurité sanitaire: faut-il craindre la transparence?* Paris: Albin Michel. 295 p.
- Hoffmann K, Boeing H, Dufour A, Volatier JL, Telman J, Virtanen M, Becker W, De Henauw S. 2002. Estimating the distribution of usual dietary intake by short-term measurements. *Eur J Clin Nutr* 56 Suppl 2:S53-62.

- Holland, al. e. 2003. Biological sample collection and processing for molecular epidemiology studies. *Mutation Research* 543:217-234.
- Hotz P, Buchet JP, Bernard A, Lison D, Lauwerys R. 1999. Renal effects of low-level environmental cadmium exposure: 5-year follow-up of a subcohort from the Cadmibel study. *Lancet* 354(9189):1508-13.
- Hoy W. 2000. Renal disease in Australian Aborigines. *Nephrol Dial Transplant* 15(9):1293-7.
- Hoy W., Vanbuynder P., Mathews J.D, Pugsley D.J. and Wang Z. 2001. Renal disease and the environment: lessons from Aboriginal Australia. *Nephrology* 6(1):19-24.
- Hrabar A, Aleraj B, Ceovic S, Cvoriscec D, Vacca C, Hall PW, 3rd. 1991. A fifteen year cohort based evaluation of beta 2-microglobulin as an early sign of Balkan endemic nephropathy. *Kidney Int Suppl* 34:S41-3.
- Hrabar A, Aleraj B, Ceovic S, Cvoriscec D, Vacca C, Hall PW, 3rd. 1991. Beta 2-microglobulin studies in endemic Balkan nephropathy. *Kidney Int Suppl* 34:S38-40.
- Hranjec T, Kovac A, Kos J, Mao W, Chen JJ, Grollman AP, Jelakovic B. 2005. Endemic nephropathy: the case for chronic poisoning by aristolochia. *Croat Med J* 46(1):116-25.
- Hsieh MF, Chiu HY, Lin-Tan DT, Lin JL. 2004. Does human ochratoxin A aggravate proteinuria in patients with chronic renal disease? *Ren Fail* 26(3):311-6.
- Hultberg B, Isaksson A, Krutzen E, Nilsson-Ehle P. 1989. Urinary excretion of N-acetyl-beta-D-glucosaminidase in normal and complicated pregnancy. *J Clin Chem Clin Biochem* 27(8):487-9.
- Hussein HS, Brasel JM. 2001. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology* 167(2):101-34.
- IARC. 1993. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Ochratoxin A. 56:489-521.
- Iavicoli I, Brera C, Carelli G, Caputi R, Marinaccio A, Miraglia M. 2002. External and internal dose in subjects occupationally exposed to ochratoxin A. *Int Arch Occup Environ Health* 75(6):381-6.
- IEFS. 1998. Multi-centre study of the influence of survey duration on food intakes. Dublin: Trinity College.
- IEFS. 2001. Exploring how variability in food intake input data presentation may influence the outcome of stochastic models for estimating exposure to food chemical. Dublin: Trinity College.
- International Federation for Red Cross and Red Crescent Societies (IFRCRCS). 2003. Tunisia floods. Appeal n°04/03. <<http://www.ifrc.org/docs/appeals/03/0403.pdf>>.
- Ikeda M, Moon CS, Zhang ZW, Iguchi H, Watanabe T, Iwami O, Imai Y, Shimbo S. 1995. Urinary alpha1-microglobulin, beta2-microglobulin, and retinol-binding protein levels in general populations in Japan with references to cadmium in urine, blood, and 24-hour food duplicates. *Environ Res* 70(1):35-46.
- Institut National de la Statistique. 1994. Recensement Général de la Population et de le l'Habitat 1994 - Fascicule 1: Principales caractéristiques démographiques de la population. In: Ministère du Développement Economique, editor: République Tunisienne.
- Institut National de la Statistique. 1998. Enquête Nationale sur le Budget, la Consommation et le Niveau de Vie des Ménages 1995 - Volume B: Résultats de l'Enquête Alimentaire et Nutritionnelle. In: Ministère du Développement Economique, editor: République Tunisienne.
- Institut National de la Statistique. 1999. Enquête Nationale Population Emploi. In: Ministère du Développement Economique, editor: République Tunisienne.
- Institut National de la Statistique. 2000a. Annuaire statistique de la Tunisie 2000 N°43. In: Ministère du Développement Economique, editor: République Tunisienne.

Institut National de la Statistique. 2000b. Enquête Nationale sur le Budget, la Consommation et le Niveau de Vie des Ménages 2000 - Volume A:- Résultats de l'Enquête sur le Budget des Ménages. In: Ministère du Développement Economique, editor: République Tunisienne.

Institut National de la Statistique. 2000c. Enquête Nationale sur le Budget, la Consommation et le Niveau de Vie des Ménages 2000 - Volume B:- Résultats de l'Enquête Alimentaire et Nutritionnelle. In: Ministère du Développement Economique, editor: République Tunisienne.

Institut National de la Statistique. 2003. In: Ministère du Développement et de la Coopération Internationale, editor. Bulletin Mensuel de Statistique: République Tunisienne. p 7.

International Programme on Chemical Safety. 1990. Selected mycotoxins: ochratoxins, trichotecenes, ergot. Geneva: WHO, UNEP, ILO. < <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc105.htm>>.

Ireland J, van Erp-Baart AM, Charrondiere UR, Moller A, Smithers G, Trichopoulou A. 2002. Selection of a food classification system and a food composition database for future food consumption surveys. *Eur J Clin Nutr* 56 Suppl 2:S33-45.

Isacson D, Bingefors K. 2002. Epidemiology of analgesic use: a gender perspective. *Eur J Anaesthesiol Suppl* 26:5-15.

Jacobs C, Selwood N. 1995. Renal replacement therapy for end-stage renal failure in France: current status and evolutive trends over the last decade. *American Journal of Kidney Disease* 25:188-195.

Jafar TH, Schmid CH, Stark PC, Toto R, Remuzzi G, Ruggenti P, Marcantoni C, Becker G, Shahinfar S, De Jong PE and others. 2003. The rate of progression of renal disease may not be slower in women compared with men: a patient-level meta-analysis. *Nephrol Dial Transplant* 18(10):2047-53.

Jaffé M. 1886. Ueber den Reiderschlag, welchen Pikrinsaeure in normalen Harn erzeugt and ueber neue Reuktion des Kreatinins. *Z. Phys. Chem.* 10:391-400.

Jager KJ, vanDijk PC, Dekker FW, Stengel B, Simpson K, Briggs JD. 2003. The epidemic of aging in renal replacement therapy: an update on elderly patients and their outcomes. *Clinical nephrology* 60(5):352-60.

Jahns L, Carriquiry A, Arab L, Mroz TA, Popkin BM. 2004. Within- and between-person variation in nutrient intakes of Russian and U.S. children differs by sex and age. *J Nutr* 134(11):3114-20.

Jaouadi T. 2000. Evolution du comportement alimentaire tunisien. In: Padilla M, Oberti B, editors. Alimentation et nourritures autour de la Méditerranée. Paris: Karthala. 264 p.

JECFA. 2001. Safety evaluation of certain mycotoxins in food. Prepared by the 56th meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Food Additives Series 47.

Jekanowski M.D., Binkley J. 2000. Food purchase diversity across U.S. markets. *Agribusiness* 16(4):417-433.

Jensen J. 1996. An introduction to bayesian networks. 1<sup>st</sup> Edition. London: UCL Press. 186 p.

Jevremovic I, Jankovic S, Radovanovic Z, Danilovic V, Velimirovic D, Naumovic T, Vacca C, Stamenkovic M, Bukvic D, Stojanovic V and others. 1991. Beta 2-microglobulinuria in a population exposed to Balkan endemic nephropathy: inferences from repeated cross-sectional studies. *Kidney Int Suppl* 34:S35-7.

Jimenez AM, Lopez de Cerain A, Gonzalez-Peñas E, Bello J, Betbeder AM, Creppy E. 1998. Exposure to ochratoxin A in Europe: comparison with a region of northern Spain. *Journal of Toxicology - Toxin Reviews* 17(4):479-491.

Jin T, Nordberg M, Frech W, Dumont X, Bernard A, Ye TT, Kong Q, Wang Z, Li P, Lundstrom NG and others. 2002. Cadmium biomonitoring and renal dysfunction among a population environmentally exposed to cadmium from smelting in China (ChinaCad). *Biometals* 15(4):397-410.

- Jung KY, Endou H. 1989. Nephrotoxicity assessment by measuring cellular ATP content. II. Intranephron site of ochratoxin A nephrotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 100(3):383-390.
- Jung K, Mattenheimer H, Burchardt K. 1992. *Urinary Enzymes in Clinical and Experimental Medicine*. Berlin: Springer-Verlag. 326 p.
- Jung KY, Takeda M, Kim DK, Tojo A, Narikawa S, Yoo BS, Hosoyamada M, Cha SH, Sekine T, Endou H. 2001. Characterization of ochratoxin A transport by human organic anion transporters. *Life Sci* 69(18):2123-35.
- Jungers P. 1999. Screening for renal insufficiency: is it worth while? is it feasible? *Nephrology, Dialysis, Transplantation* 14:2082-2084.
- K/DOQI. 2002. Clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification and stratification. *American Journal of Kidney Diseases* 39(2-Suppl.1):S93-S102.
- Kaaks RJ. 1997. Biochemical markers as additional measurements in studies of the accuracy of dietary questionnaire measurements: conceptual issues. *Am J Clin Nutr* 65(4 Suppl):1232S-1239S.
- Kaaks R, Ferrari P, Ciampi A, Plummer M, Riboli E. 2002. Uses and limitations of statistical accounting for random error correlations, in the validation of dietary questionnaire assessments. *Public Health Nutr* 5(6A):969-76.
- Kabagambe EK, Baylin A, Allan DA, Siles X, Spiegelman D, Campos H. 2001. Application of the method of triads to evaluate the performance of food frequency questionnaires and biomarkers as indicators of long-term dietary intake. *Am J Epidemiol* 154(12):1126-35.
- Kaiss H. 1999. Apport de l'étude des néphropathies interstitielles chroniques dans le centre tunisien. Monastir: Université du Centre, Faculté de Médecine de Monastir. 125 p.
- Kamimura H, Ogata H, Takahara H. 1992. Alpha-glucoside formation of xenobiotics by rat liver alpha-glucosidases. *Drug Metab Dispos* 20(2):309-15.
- Karkeck JM. 1987. Improving the use of dietary survey methodology. *J Am Diet Assoc* 87(7):869-71.
- Kausz AT, Obrador GT, Arora P, Ruthazer R, Levey AS, Pereira BJ. 2000. Late initiation of dialysis among women and ethnic minorities in the United States. *J Am Soc Nephrol* 11(12):2351-7.
- Keith DS, Nichols GA, Gullion CM, Brown JB, Smith DH. 2004. Longitudinal follow-up and outcomes among a population with chronic kidney disease in a large managed care organization. *Arch Intern Med* 164(6):659-63.
- Kensler TW, Egner PA, Wang JB, Zhu YR, Zhang BC, Qian GS, Kuang SY, Gange SJ, Jacobson LP, Munoz A and others. 2002. Strategies for chemoprevention of liver cancer. *Eur J Cancer Prev* 11 Suppl 2:S58-64.
- Khalef A, Benabadi M, Rayan T, Haddoumi F. 1993b. Présence de l'ochratoxine A dans le sang humain et néphropathie en Algérie. In: Creppy EE, Castegnaro M, Dirheimer G, editors. *Colloques INSERM; 1993b*. INSERM John Libbey Eurotext. London. p 235-238.
- Khalef A, Zidane C, Charef A, Gharbi A, Tadjerouna M, Betbeder AM, Creppy E. 1993a. Ochratoxicose humaine en Algérie. In: Creppy EE, Castegnaro M, Dirheimer G, editors. *Colloques INSERM; 1993a*. INSERM John Libbey Eurotext. London. p 123-127.
- Klaassen CD. 1986. Distribution, excretion and absorption of toxicants. In: Klassen CD, Amdur MO, Doull J, editors. *Casarett and Doull's Toxicology. The basic science of poisons*. 3rd ed. New York: Macmillan. p 33-63.
- Kohno M, Kanayama Y, Yasunari K, Kawarabayashi T, Murakawa K, Takeuchi K, Inoue T, Takeda T. 1985. Significance of the measurement of urinary alanine aminopeptidase and N-acetyl-beta-D-glucosaminidase activity in evaluating patients with essential hypertension. *Clin Exp Hypertens A* 7(10):1347-60.
- Krippendorff K. 1980. *Content analysis: an introduction to its methodology*. Beverly Hills: Sage Publications. 192 p.
- Kroes, al. e. 2002. Assessment of intake from the diet. *Food and Chemical Toxicology* 40:327-385.

- Krogh P, Hald B, Pedersen EJ. 1973. Occurrence of ochratoxin A and citrinin in cereals associated with mycotoxic porcine nephropathy. *Acta Pathol Microbiol Scand [B] Microbiol Immunol* 81(6):689-95.
- Krogh et al. 1973. Occurrence of ochratoxin A and citrinin in cereals associated with mycotoxic porcine nephropathy. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavia. Section B: Microbiology and Immunology* 81(6):689-695.
- Krogh et al. 1974. Experimental porcine nephropathy. Changes of renal function and structure induced by ochratoxin A-contaminated feed. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavia. Section A* 246(Suppl.):1-21.
- Krogh P, Elling F, Gyrd-Hansen N, Hald B, Larsen AE, Lillehoj EB, Madsen A, Mortensen HP, Ravnskov U. 1976. Experimental porcine nephropathy: changes of renal function and structure perorally induced by crystalline ochratoxin A. *Acta Pathol Microbiol Scand [A]* 84(5):429-34.
- Krogh P, Elling F. 1976. Letter: Fungal toxins and endemic (Balkan) nephropathy. *Lancet* 7975(2):40.
- Krogh P, Elling F, Friis C, Hald B, Larsen AE, Lillehoj EB, Madsen A, Mortensen HP, Rasmussen F, Ravnskov U. 1979. Porcine nephropathy induced by long-term ingestion of ochratoxin A. *Vet Pathol* 16(4):466-75.
- Krogh P, Hald B, Plestina R, Ceovic S. 1977. Balkan (endemic) nephropathy and foodborn ochratoxin A: preliminary results of a survey of foodstuffs. *Acta Pathol Microbiol Scand [B]* 85(3):238-40.
- Krogh P. 1992. Role of ochratoxin in disease causation. *Food Chem Toxicol* 30(3):213-24.
- Kuhn I, Valenta H, Rohr K. 1995. Determination of ochratoxin A in bile of swine by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Appl* 668(2):333-7.
- Kumagai S, Aibara K. 1982. Intestinal absorption and secretion of ochratoxin A in the rat. *Toxicology and Applied Pharmacology* 64(1):94-102.
- Kumagai S. 1985. Ochratoxin A: plasma concentration and excretion into bile and urine in albumin-deficient rats. *Food Chemistry and Toxicology* 23:941-943.
- Kuiper-Goodman T. 1996. Risk assessment of ochratoxin A: an update. *Food Addit Contam* 13 Suppl:53-7.
- Kuiper-Goodman T. 1999. Approaches to the risk analysis of mycotoxins in the food supply. *Food, Nutrition and Agriculture* 23:10-16.
- Lamb EJ, O'Riordan SE, Delaney MP. 2003. Kidney function in older people: pathology, assessment and management. *Clinica Chimica Acta* 334:25-40.
- Lambe J, Kearney J, Leclercq C, Zunft HF, De Henauw S, Lamberg-Allardt CJ, Dunne A, Gibney MJ. 2000. The influence of survey duration on estimates of food intakes and its relevance for public health nutrition and food safety issues. *Eur J Clin Nutr* 54(2):166-73.
- Lambe J., Gilsenan M., Kearney J., Gibney M.J. 2001. Exploring how variability in food intake input data presentation may influence the output of stochastic models for estimating exposure to food chemical. Available online at: <http://www.tchpc.tcd.ie/montecarlo/reports/pdf/ieffs1ac.pdf>.
- Lambe J. 2002. The use of food consumption data in assessments of exposure to food chemicals including the application of probabilistic modelling. *Proc Nutr Soc* 61(1):11-8.
- Landi MT, Caporaso N. 1997. Sample collection, processing and storage. In: Toniolo, al. e, editors. *Application of biomarkers to cancer epidemiology: IARC Scientific Publications*. p 223-236.
- Lara JJ, Scott JA, Lean ME. 2004. Intentional mis-reporting of food consumption and its relationship with body mass index and psychological scores in women. *J Hum Nutr Diet* 17(3):209-18.
- Larkin FA, Metzner HL, Guire KE. 1991. Comparison of three consecutive-day and three random-day records of dietary intake. *J Am Diet Assoc* 91(12):1538-42.

- Larmet G. 2002. L'organisation des achats alimentaires. *Cahiers d'économie et de sociologie rurales* 63:51-84.
- Lauritsen JM, Bruus M, Myatt M. 2002. EpiData, un outil destiné à la saisie contrôlée de données et à la documentation des données. Version 3.1. Comté de Funen: Danemark & Brixton Health, Royaume Uni.
- Lauwerys, R. Amery, A. Bernard, A. Bruaux, P. Buchet, J. P. Claeys, F. De Plaen, P. Ducoffre, G. Fagard, R. Lijnen, P. et al. 1990. Health effects of environmental exposure to cadmium: objectives, design and organization of the Cadmibel Study: a cross-sectional morbidity study carried out in Belgium from 1985 to 1989. *Environmental Health Perspectives* 87:283-89.
- Lauwerys R, Bernard A, Cardenas A. 1992. Monitoring of early nephrotoxic effects of industrial chemicals. *Toxicol Lett* 64-65 Spec No:33-42.
- Lauwerys RR, Bernard A, Roels H, Buchet JP. 1995. Health risk assessment of long-term exposure to non-genotoxic chemicals: application of biological indices. *Toxicol Lett* 77(1-3):39-44.
- Le Bihan G., Roques N. 2004. Comportements d'achats alimentaires. In: INPES, editor. *Baromètre Santé Nutrition 2002*. p 147-159.
- Leblanc J.-C., Tard A., Volatier J.-L., Verger P. 2005. Dietary exposure estimates of main food mycotoxins from the first French Total Diet Study. *Food Addit Contam* 22(7):652-72.
- Leclercq C, Arcella D, Le Donne C, Piccinelli R, Sette S, Soggiu ME. 2003. Stochastic modelling of human exposure to food chemicals and nutrients within the "Montecarlo" project: an exploration of the influence of brand loyalty and market share on intake estimates of intense sweeteners from sugar-free soft drinks. *Toxicol Lett* 140-141:443-57.
- Lekouch N, Sedki A, Nejmeddine A, Gamon S. 2001. Lead and traditional Moroccan pharmacopoeia. *Sci Total Environ* 280(1-3):39-43.
- Levey AS, Bosch JP, Lewis, J.B., Greene, T., Rogers N, Roth D. 1999. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Study Group. *Annals of Internal Medicine* 130:461-470.
- Li S, Marquardt RR, Frohlich AA, Vitti TG, Crow G. 1997. Pharmacokinetics of ochratoxin A and its metabolites in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 145(1):82-90.
- Li S, Marquardt RR, Frohlich AA. 2000. Identification of ochratoxins and some of their metabolites in bile and urine of rats. *Food Chem Toxicol* 38(2-3):141-52.
- Lichtman SW, Pisarska K, Berman ER, Pestone M, Dowling H, Offenbacher E, Weisel H, Heshka S, Matthews DE, Heymsfield SB. 1992. Discrepancy between self-reported and actual caloric intake and exercise in obese subjects. *N Engl J Med* 327(27):1893-8.
- Lindeman R. 1998. Is the decline in renal function with normal aging inevitable? *Geriatric Nephrology and Urology* 8(1):7-9.
- Liu K, Stamler J, Dyer A, McKeever J, McKeever P. 1978. Statistical methods to assess and minimize the role of intra-individual variability in obscuring the relationship between dietary lipids and serum cholesterol. *J Chronic Dis* 31(6-7):399-418.
- Livingstone MB, Black AE. 2003. Markers of the validity of reported energy intake. *J Nutr* 133 Suppl 3:895S-920S.
- Maaroufi K, Achour A, Betbeder AM, Hammami M, Ellouz F, Creppy E, Bacha H. 1995a. Foodstuffs and human blood contamination by the mycotoxin ochratoxin A: correlation with chronic interstitial nephropathy in Tunisia. *Archives of Toxicology* 69:552-558.
- Maaroufi K, Achour A, Hammami M, Betbeder AM, Ellouz F, Creppy E, Bacha H. 1995b. Ochratoxin A in human blood in relation to nephropathy in Tunisia. *Human and Experimental Toxicology* 14:609-615.

- Maaroufi K, Zakhama A, Baudrimont I, Achour A, Abid S, Ellouz F, Dhoub S, Creppy EE, Bacha H. 1999. Karyomegaly of tubular cells as early stage marker of the nephrotoxicity induced by ochratoxin A in rats. *Hum Exp Toxicol* 18(6):410-5.
- Madhyastha MS, Marquardt RR, Frohlich AA. 1992. Hydrolysis of ochratoxin A by the microbial activity of digesta in the gastrointestinal tract of rats. *Arch Environ Contam Toxicol* 23(4):468-72.
- MAFF. 1999. Survey of human exposure to ochratoxin A. In: Ministry of Agriculture Forestry and Fisheries, editor: Food Surveillance Information Sheet.
- Mallick N, Gokal R. 1999. Haemodialysis. *The Lancet* 353:737-742.
- Mansell MA, Jones NF, Ziroyannis PN, Marson WS. 1978. N-acetyl-beta-D-glucosaminidase: A new approach to the screening of hypertensive patients for renal disease. *Lancet* 2(8094):803-5.
- Mantle PG, McHugh KM, Adatia R, Gray T, Turner DR. 1991a. Persistent karyomegaly caused by *Penicillium* nephrotoxins in the rat. *Proc Biol Sci* 246(1317):251-9.
- Mantle PG, McHugh KM, Adatia R, Heaton JM, Gray T, Turner DR. 1991b. *Penicillium aurantiogriseum*-induced, persistent renal histopathological changes in rats; an experimental model for Balkan endemic nephropathy competitive with ochratoxin A. In: Castegnaro M, Plestina R, Dirheimer G, Chernozemsky IN, Bartsch H, editors. *Mycotoxins Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours*.: IARC. Lyon. p 119-27.
- Marquardt RR, Frohlich AA. 1992. A review of recent advances in understanding ochratoxicosis. *J Anim Sci* 70(12):3968-88.
- Mattenheimer H, Maruhn D. 1992. Preanalytical treatment of urine. In: Jung K, Mattenheimer H, Burchardt U, editors. *Urinary Enzymes in Clinical and Experimental Medicine*: Springer-Verlag. Berlin.
- McCullagh P, Nelder JA. 1989. *Generalized Linear Models*, Second Edition. Chapman and Hall, editor. London.
- McDonald S, Russ G, Kerr P, Collins J. 2002. ESRD in Australia and New Zealand at the end of the millenium: a report from the ANZDATA registry. *American Journal of Kidney Disease* 40(6):1122-1131.
- McMichael AJ. 1999. Prisoners of the proximate: loosening the constraints on epidemiology in an age of change. *Am J Epidemiol* 149(10):887-97.
- Mengoli C, Lechi A, Arosio E, Rizzotti P, Lechi C, Corgnati A, Micciolo R, Pancera P. 1982. Contribution of four markers of tubular proteinuria in detecting upper urinary tract infections. A multivariate analysis. *Nephron* 32(3):234-8.
- Mennen LI, Bertrais S, Galan P, Arnault N, Potier de Couray G, Hercberg S. 2002. The use of computerised 24 h dietary recalls in the French SU.VI.MAX Study: number of recalls required. *Eur J Clin Nutr* 56(7):659-65.
- Mihatsch MJ, Gudat F, Zollinger HU, Heierli C, Tholen H, Reutter FW. 1979. Systemic karyomegaly associated with chronic interstitial nephritis. A new disease entity? *Clin Nephrol* 12(2):54-62.
- Mills JT. 1990. Mycotoxins and toxigenic fungi on cereal grains in western Canada. *Can J Physiol Pharmacol* 68(7):982-6.
- Miraglia M, Brera C. 2002. SCOOP Task 3.2.7 "Assessment of dietary intake of Ochratoxin A by the population of EU Member States". <[http://europa.eu.int/comm/food/fs/scoop/3.2.7\\_en.pdf](http://europa.eu.int/comm/food/fs/scoop/3.2.7_en.pdf)>.
- Moch H, Spondlin M, Schmassmann A, Mihatsch MJ. 1994. [Systemic karyomegaly with chronic interstitial nephritis. Discussion of the disease picture based on an autopsy case]. *Pathologie* 15(1):44-8.
- Mogensen CE, Christensen CK. 1984. Predicting diabetic nephropathy in insulin-dependent patients. *New England Journal of Medicine* 31:89-93.
- Mogensen CE. 1987. Microalbuminuria as a predictor of clinical diabetic nephropathy. *Kidney Int* 31(2):673-89.

- Mogensen CE. 1995. Microalbuminuria in prediction and prevention of diabetic nephropathy in insulin-dependent diabetes mellitus patients. *Journal of Diabetes and its Complications* 9:337-349.
- Mokhtar N, Elati J, Chabir R, Bour A, Elkari K, Schlossman NP, Caballero B, Aguenau H. 2001. Diet culture and obesity in northern Africa. *J Nutr* 131(3):887S-892S.
- Morita A, et al. 1998. Stabilities of N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG) isoenzymes in urine: advantage of NAG isoenzymes B measurement in clinical applications. *Clinica Chimica Acta* 278:35-43.
- Moulton LH, Port FK, Wolfe RA, Foxman B, Guire KE. 1992. Patterns of low incidence of treated end-stage renal disease among the elderly. *American Journal of Kidney Disease* XX(1):55-62.
- Mucci LA, Dickman PW, Steineck G, Adami HO, Augustsson K. 2003. Dietary acrylamide and cancer of the large bowel, kidney, and bladder: absence of an association in a population-based study in Sweden. *Br J Cancer* 88(1):84-9.
- Mucci LA, Lindblad P, Steineck G, Adami HO. 2004. Dietary acrylamide and risk of renal cell cancer. *Int J Cancer* 109(5):774-6.
- Mueller PW, Lash LH, Price RG, Stolte H, Gelpi E, Maack T, Berndt WO. 1997. Urinary biomarkers to detect significant effects of environmental and occupational exposure to nephrotoxins. I. Categories of tests for detecting effects of nephrotoxins. *Ren Fail* 19(4):505-21.
- Mueller et al. 1997. Urinary biomarkers to detect significant effects of environmental and occupational exposure to nephrotoxins. I. Categories of tests for detecting effects of nephrotoxins. *Renal Failure* 19(4):505-521.
- Mulder W, Hillen H. 2001a. Renal function and renal disease in the elderly: part I. *European Journal of Internal Medicine* 12:86-97.
- Mulder W, Hillen H. 2001b. Renal function and renal disease in the elderly: part II. *European Journal of Internal Medicine* 12:327-333.
- Munro IC, Moodie CA, Kuiper-Goodman T, Scott PM, Grice HC. 1974. Toxicologic changes in rats fed graded dietary levels of ochratoxin A. *Toxicol Appl Pharmacol* 28(2):180-8.
- Mutti A, Alinovi R, Bergamaschi E, Franchini I. 1992. Reference values for early markers of renal damage. *Sci Total Environ* 120(1-2):7-15.
- Myers GJ, Davidson PW, Cox C, Shamlaye CF, Palumbo D, Cernichiari E, Sloane-Reeves J, Wilding GE, Kost J, Huang LS and others. 2003. Prenatal methylmercury exposure from ocean fish consumption in the Seychelles child development study. *Lancet* 361(9370):1686-92.
- Nakadaira H, Nishi S. 2003. Effects of low-dose cadmium exposure on biological examinations. *Sci Total Environ* 308(1-3):49-62.
- National Toxicology Program. 1989. Toxicology and carcinogenesis studies of ochratoxin A in F344/N rats (Gavage studies). National Toxicology Program: Technical Report Series 358:1-142.
- Nelson M, Black AE, Morris JA, Cole TJ. 1989. Between- and within-subject variation in nutrient intake from infancy to old age: estimating the number of days required to rank dietary intakes with desired precision. *Am J Clin Nutr* 50(1):155-67.
- Newman DJ, Pugia MJ, Lott JA, Wallace JF, Hiar AM. 2000. Urinary protein and albumin excretion corrected by creatinine and specific gravity. *Clin Chim Acta* 294(1-2):139-55.
- Nguyen-Thanh V. 2003. Validation d'une méthode de mesure de la consommation alimentaire et de l'activité physique dans la population tunisienne adulte. Paris. Mémoire de fin d'études pour l'obtention du diplôme d'ingénieur agronome de l'INA P-G.

- Nikolov IG, Petkova-Bocharova D, Castegnaro M, Pfohl-Leskowicz A, Gill C, Day N, Chernozemsky IN. 1996. Molecular and epidemiological approaches to the etiology of urinary tract tumors in an area with Balkan endemic nephropathy. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 15(2-4):201-7.
- NNT (1991): Health evaluation of ochratoxin A in food products. Nordiske Seminar- og Arbejdsrapporter 1991:545. Nordiska Ministerrådet, Köpenhamn, Danmark.
- Nishijo M, Nakagawa H, Morikawa Y, Tabata M, Senma M, Kitagawa Y, Kawano S, Ishizaki M, Sugita N, Nishi M and others. 1994. Prognostic factors of renal dysfunction induced by environmental cadmium pollution. *Environ Res* 64(2):112-21.
- Nishijo, al. e. 1994. Prognostic factors of renal dysfunction induced by environmental cadmium pollution. *Environmental Research* 64(2):112-121.
- Nusser S.M., Carriquiry A.L., Dodd K.W., Fuller W.A. 1996. A semi-parametric transformation approach to estimating usual daily intake distributions. *Journal of the American Statistical Association* 91:1440-1449.
- Nuyts GD, Van Vlem E, Thys J, De Leersnijder D, D'Haese PC, Elseviers MM, De Broe ME. 1995. New occupational risk factors for chronic renal failure. *Lancet* 346(8966):7-11.
- O'Brien E, Dietrich DR. 2005. Ochratoxin A: the continuing enigma. *Crit Rev Toxicol* 35(1):33-60.
- Ocke MC, Kaaks RJ. 1997. Biochemical markers as additional measurements in dietary validity studies: application of the method of triads with examples from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Am J Clin Nutr* 65(4 Suppl):1240S-1245S.
- Olsen M., Thorup I., Knudsen I., Larsen J.-J., Hald B., Olsen J. 1991. Health evaluation of ochratoxin A in food products. In: Nordic Council of Ministers, Copenhagen, editors.
- Ominski KH, Frohlich AA, Marquardt RR, Crow GH, Abramson D. 1996. The incidence and distribution of ochratoxin A in western Canadian swine. *Food Addit Contam* 13(2):185-98.
- Orti DL, Hill RH, Jr., Liddle JA, Needham LL, Vickers L. 1986. High performance liquid chromatography of mycotoxin metabolites in human urine. *J Anal Toxicol* 10(2):41-5.
- 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(1):9-13.
- Paigen K, al e. 1984. A genetic component in human lysosomal enzyme excretion. *Biochemical Genetics* 22(5-6):517-527.
- Palaniappan U, Cue RI, Payette H, Gray-Donald K. 2003. Implications of day-to-day variability on measurements of usual food and nutrient intakes. *J Nutr* 133(1):232-5.
- Palli D, Miraglia M, Saieva C, Masala G, Cava E, Colatosti M, Corsi AM, 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(3):265-9.
- Park DL. 2002. Effect of processing on aflatoxin. *Adv Exp Med Biol* 504:173-9.
- Parry C, Eaton J. 1991. Kohl: a lead-hazardous eye makeup from the Third World to the First World. *Environ Health Perspect* 94:121-3.
- Parving, al. e. 1982. Early detection of patients at risk of developing diabetic nephropathy: longitudinal study of urinary albumin excretion. *Acta Endocrinologica* 100:550-555.
- Pascale M, Visconti A. 2001. Rapid method for the determination of ochratoxin A in urine by immuno-affinity column clean-up and high-performance liquid chromatography. *Mycopathologia* 152(2):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 [B]* 87(4):243-6.
- Pearce N. 1996. Traditional epidemiology, modern epidemiology, and public health. *Am J Public Health* 86(5):678-83.
- Pearce N. 1999. Epidemiology as a population science. *Int J Epidemiol* 28(5):S1015-8.
- Peers FG, Linsell CA. 1973. Dietary aflatoxins and liver cancer--a population based study in Kenya. *Br J Cancer* 27(6):473-84.
- Peers FG, Linsell CA. 1977. Dietary aflatoxins and human primary liver cancer. *Ann Nutr Aliment* 31(4-6):1005-17.
- Peraica M, Domijan AM, Fuchs R, Lucic A, Radic B. 1999. The occurrence of ochratoxin A in blood in general population of Croatia. *Toxicol Lett* 110(1-2):105-12.
- Peraica M, Domijan AM, 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(7):410-4.
- Perneger, al. e. 1995a. Studying the causes of kidney disease in humans: a review of methodologic obstacles and possible solutions. *American Journal of Kidney Diseases* 25(5):722-731.
- Perneger TV, Whelton PK, Klag MJ. 1995b. Race and end-stage renal disease. Socioeconomic status and access to health care as mediating factors. *Arch Intern Med* 155(11):1201-8.
- Petkova-Bocharova T, Castegnaro M. 1985. Ochratoxin A contamination of cereals in an area of high incidence of Balkan endemic nephropathy in Bulgaria. *Food Addit Contam* 2(4):267-70.
- Petkova-Bocharova T, Chernozemsky IN, Castegnaro M. 1988. Ochratoxin A in human blood in relation to Balkan endemic nephropathy and urinary system tumours in Bulgaria. *Food Addit Contam* 5(3):299-301.
- Petkova-Bocharova T, Castegnaro M. 1991. Ochratoxin A in human blood in relation to Balkan endemic nephropathy and urinary tract tumours in Bulgaria. *IARC Sci Publ*(115):135-7.
- Petkova-Bocharova D, Castegnaro M, Pfohl-Leskowicz A, Garren L, Grosso F, Nikolov IG, Vrabcheva T, Dragacci S, Chernozemsky IN. 2003. Analysis of ochratoxin A in serum and urine of inhabitants from an area with Balkan Endemic Nephropathy: a month follow-up study. *Facta Universitatis. Series: Medicine and Biology* 10(2):62-68.
- Pfohl-Leskowicz, al. e. 2002. Balkan endemic nephropathy and associated urinary tract tumours: a review of aetiological causes and the potential role of mycotoxins. *Food Additives and Contaminants* 19(3):282-302.
- Pfohl-Leskowicz A, Molinié A. 2004. Etude des effets biologiques de l'exposition combinée de l'ochratoxine A et de la citrinine, in vitro et in vivo. In: *Présentation de l'action transversale INRA "Mycotoxines" 2001-2004*, editor. Toulouse.
- Pickle L, White A. 1995. Effects of the choice of age-adjustment method on maps of death rates. *Statistics in medicine* 14:615-627.
- Pitt JI. 2002. Biology and ecology of toxigenic *Penicillium* species. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 504:29-41.
- Pitt JI. 1987. *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum*, and production of ochratoxin A. *Appl Environ Microbiol* 53(2):266-9.
- Pitt J.I. 2000. Toxigenic fungi and mycotoxins. *Br Med Bull* 56(1):184-92.

- Pittet A. Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds: a decade in review. In: de Koe WJ, Samson RA, van Egmond HP, Gilbert J, Sabino M, editors. *Mycotoxins and phycotoxins at the turn of the millennium*; 2001; Guarujá (Brazil). p 153-172.
- Plestina R, Ceovic S, Gatenbeck S, Habazin-Novak V, Hult K, Hokby E, Krogh P, Radic B. 1990. Human exposure to ochratoxin A in areas of Yugoslavia with endemic nephropathy. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 10(3):145-8.
- Plestina R. 1992. Some features of Balkan endemic nephropathy. *Food Chem Toxicol* 30(3):177-81.
- Ponce RA, Bartell SM, Kavanagh TJ, Woods JS, Griffith WC, Lee RC, Takaro TK, Faustman EM. 1998. Uncertainty analysis methods for comparing predictive models and biomarkers: A case study of dietary methyl mercury exposure. *Regul Toxicol Pharmacol* 28(2):96-105.
- Prentice RL. 2003. Dietary assessment and the reliability of nutritional epidemiology reports. *Lancet* 362(9379):182-3.
- Price et al. 1997. Urinary biomarkers to detect significant effects of environmental and occupational exposure to nephrotoxins. III. Minimal battery of tests to assess sub-clinical nephrotoxicity for epidemiological studies based on current knowledge. *Renal Failure* 19(4):535-552.
- Price G. 2000. Urinalysis to exclude and monitor nephrotoxicity. *Clinica Chimica Acta* 297(173-182).
- Price R. 2004. Communication personnelle.
- Price RG. 1992. The role of NAG (N-acetyl-beta-D-glucosaminidase) in the diagnosis of kidney disease including the monitoring of nephrotoxicity. *Clin Nephrol* 38 Suppl 1:S14-9.
- 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(2):175-80.
- Radic B, Fuchs R, Peraica M, Lucic A. 1997. Ochratoxin A in human sera in the area with endemic nephropathy in Croatia. *Toxicol Lett* 91(2):105-9.
- Radonic M. 1978. beta2-Microglobulin in Balkan endemic nephropathy. *Pathol Biol (Paris)* 26(6):317-20.
- Radovanovic Z, Jankovic S, Jevremovic I. 1991. Incidence of tumors of urinary organs in a focus of Balkan endemic nephropathy. *Kidney Int Suppl* 34:S75-6.
- Radonic M, Radosevic Z. 1992. Clinical features of Balkan endemic nephropathy. *Food Chem Toxicol* 30(3):189-92.
- Rashad FA, Vacca CV, Speroff T, Hall PW, 3rd. 1991. Altered urinary beta 2-microglobulin excretion as an index of nephrotoxicity. *Kidney Int Suppl* 34:S18-20.
- REIN. 2004. Réseau français des traitements de suppléance de l'insuffisance rénale chronique - Rapport annuel 2002. Paris.
- REIN. 2005. Registre français des traitements de suppléance de l'insuffisance rénale chronique - Rapport annuel 2003. Paris.
- République Tunisienne. 2000. Le développement de l'éducation en Tunisie, 1996-2000. In: Ministère de l'Éducation, editor. p 101.
- République Tunisienne. 2001. L'agriculture tunisienne en l'an 2000 - Extrait du rapport de la banque centrale de Tunisie. In: Ministère de l'Agriculture, Observatoire National de l'Agriculture, editors.
- République Tunisienne. 2001. Rapport de synthèse de l'activité des centres d'hémodialyse pour l'année 2001. In: Direction de la Réglementation et du Contrôle des Professions de Santé, editor. Données infrastructurales et épidémiologiques: Ministère de la Santé Publique.

- Richard JL, Plattner RD, May J, Liska SL. 1999. The occurrence of ochratoxin A in dust collected from a problem household. *Mycopathologia* 146(2):99-103.
- Rietveld T., van Hout R. 1993. *Statistical techniques for the study of language and language behaviour*: Mouton de Gruyter. Berlin. 400 p.
- Roels HA, Hoet P, Lison D. 1999. Usefulness of biomarkers of exposure to inorganic mercury, lead, or cadmium in controlling occupational and environmental risks of nephrotoxicity. *Ren Fail* 21(3-4):251-62.
- Rose G. 1992. *The strategy of preventive medicine*. New York: Oxford University Press. 138 p.
- Roth A, Chakor K, Creppy EE, Kane A, Rosenthaler R, Dirheimer G. 1988. Evidence for an entero-hepatic circulation of ochratoxin A in mice. *Toxicology* 48(3):293-308.
- Rothman N, Stewart WF, Schulte PA. 1995. Incorporating biomarkers into cancer epidemiology: a matrix of biomarker and study design categories. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 4(4):301-11.
- Rothman K.J., Greenland S. 1998. *Modern epidemiology*. Second edition. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins. 737 p.
- Rumeau-Rouquette C, Blondel B, Kaminski M, Bréart G. 1993. Du bon usage des statistiques sanitaires en épidémiologie. *Epidemiologie: méthodes et pratiques*. Paris: Flammarion Médecine-Sciences. p 63-69.
- Rutkowski B. 2000. Changing pattern of end-stage renal disease in central and eastern Europe. *Nephrology, Dialysis, Transplantation* 15:156-160.
- Sabra A. 2001. Aspects épidémiologiques de l'insuffisance rénale chronique dans la région du Centre. Monastir: Université du Centre, Faculté de Médecine de Monastir. 90 p.
- Ryu D, Jackson LS, Bullerman LB. 2002. Effects of processing on zearalenone. *Adv Exp Med Biol* 504:205-16.
- Satko SG, Freedman BI. 2005a. The familial clustering of renal disease and related phenotypes. *Med Clin North Am* 89(3):447-56.
- Satko SG, Freedman BI, Moossavi S. 2005b. Genetic factors in end-stage renal disease. *Kidney Int Suppl*(94):S46-9.
- Sauvant C, Holzinger H, Gekle M. 2005. The nephrotoxin ochratoxin A induces key parameters of chronic interstitial nephropathy in renal proximal tubular cells. *Cell Physiol Biochem* 15(1-4):125-34.
- Schardijn G, Statius van Eps LW, Swaak AJ, Kager JC, Persijn JP. 1979. Urinary beta 2 microglobulin in upper and lower urinary-tract infections. *Lancet* 1(8120):805-7.
- Schatzkin A, Freedman LS, Schiffman MH, Dawsey SM. 1990. Validation of intermediate end points in cancer research. *J Natl Cancer Inst* 82(22):1746-52.
- Schatzkin A, Kipnis V. 2004. Could exposure assessment problems give us wrong answers to nutrition and cancer questions? *J Natl Cancer Inst* 96(21):1564-5.
- Schelling JR, Zarif L, Sehgal A, Iyengar S, Sedor JR. 1999. Genetic susceptibility to end-stage renal disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 8(4):465-72.
- Schlatter CH, Studer-Rohr J, Rasonyi TH. 1996. Carcinogenicity and kinetic aspects of ochratoxine A. *Food Addit Contam* 13(Supplement):43-44.
- Schofield WN. 1985. Predicting basal metabolic rate, new standards and review of previous work. *Hum Nutr Clin Nutr* 39 Suppl 1:5-41.
- Schulte PA. 1989. A conceptual framework for the validation and use of biologic markers. *Environ Res* 48(2):129-44.

- Schulte PA, Perera FP. 1993. *Molecular Epidemiology: principles and practices*. San Diego: Academic Press, Inc. 588 p.
- Schulte P.A., Talaska G. 1995. Validity criteria for the use of biological markers of exposure to chemical agents in environmental epidemiology. *Toxicology* 101:73-88.
- Schulte PA, Perera FP. 1997. Transitional studies. *IARC Sci Publ*(142):19-29.
- Schwerdt G, Bauer K, Gekle M, Silbernagl S. 1996. Accumulation of ochratoxin A in rat kidney in vivo and in vitro. *Toxicology* 117:1-10.
- Schwerdt G, Freudinger R, Silbernagl S, Gekle M. 1999. Ochratoxin A-binding proteins in rat organs and plasma and in different cell lines of the kidney. *Toxicology* 135(1):1-10.
- Scientific Committee on Food (SCF). 1998. Opinion of the Scientific Committee on Food on Ochratoxin A (expressed on 17 September 1998).
- Scott PM. 1996. Effects of processing and detoxification treatments on ochratoxin A: introduction. *Food Addit Contam* 13 Suppl:19-21.
- Scott PM, Kanhere SR, Lau BP, Lewis DA, Hayward S, Ryan JJ, Kuiper-Goodman T. 1998. Survey of Canadian human blood plasma for Ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants* 15(5):555-562.
- Sempos CT, Johnson NE, Smith EL, Gilligan C. 1985. Effects of intraindividual and interindividual variation in repeated dietary records. *Am J Epidemiol* 121(1):120-30.
- Silbiger SR, Neugarten J. 1995. The impact of gender on the progression of chronic renal disease. *Am J Kidney Dis* 25(4):515-33.
- Silverman B.W. 1986. *Density Estimation for Statistics and Data Analysis*. London: Chapman and Hall.
- Simon G, Altman S. 1982. Increased serum N-acetyl-beta-D-glucosaminidase activity in human hypertension. *Clin Exp Hypertens A* 4(3):355-65.
- Singh A.K., Singh A., Engelhardt M. 1997. The lognormal distribution in environmental applications. In: EPA Technology Support Center Issue, editor.
- Skaug MA, Eduard W, Stormer FC. 2001. Ochratoxin A in airborne dust and fungal conidia. *Mycopathologia* 151(2):93-8.
- Skhiri HA, Bellaâj R, Ben Alaya N, Ben Hamida A-M. 2001. Indicateurs de santé en Tunisie, évolution des disparités inter-régionales au cours des trente dernières années. *La Tunisie médicale* 79(2):92-97.
- Skrha J, Perusicova J, Sperl M, Bendl J, Stolba P. 1989. N-acetyl-beta-glucosaminidase and albuminuria in normal and diabetic pregnancies. *Clin Chim Acta* 182(3):281-7.
- Solti L, Salamon F, Barna-Vetro I, Gyongyosi A, Szabo E, Wolfling A. 1997. Ochratoxin A content of human sera determined by a sensitive ELISA. *J Anal Toxicol* 21(1):44-8.
- Spiegelhalter D.J., Dawid A.P., Lauritzen S.P., Cowell R.G. 1993. Bayesian analysis in expert systems. *Statistical Science* 8(3):219-283.
- Spoendlin M, Moch H, Brunner F, Brunner W, Burger HR, Kiss D, Wegmann W, Dalquen P, Oberholzer M, Thiel G and others. 1995. Karyomegalic interstitial nephritis: further support for a distinct entity and evidence for a genetic defect. *Am J Kidney Dis* 25(2):242-52.
- Stander, al. e. 2001. Toxicokinetics of ochratoxin A in vervet monkeys (*Cercopithecus aethiops*). *Archives of Toxicology* 75(5):262-269.
- Stanton J. 1999. The costs of living: kidneys, dialysis, rationing and health economics in Britain, 1995-96. *Social Science and Medicine* 49:1169-1182.

- Stefanovic V, Mitic-Zlatkovic M, Cukuranovic R, Miljkovic P, Pavlovic NM, Vlahovic P. 1991. Beta 2-microglobulin in patients with Balkan nephropathy and in healthy members of their families. *Kidney Int Suppl* 34:S21-6.
- Stefanovic V, Polenakovic MH. 1991. Balkan nephropathy. Kidney disease beyond the Balkans? *Am J Nephrol* 11(1):1-11.
- Stengel B, Chouquet C, Cene S, Philippon C, Michard D, Hemon D. 1995a. Early markers of nephrotoxicity: variation factors and reproducibility. *Rev Epidemiol Sante Publique* 43(5):494-503.
- Stengel B, Cene S, Limasset JC, Protois JC, Marcelli A, Brochard P, Hemon D. 1995b. Organic solvent exposure may increase the risk of glomerular nephropathies with chronic renal failure. *Int J Epidemiol* 24(2):427-34.
- Stengel B, Watier L, Chouquet C, Cene S, Philippon C, Hemon D. 1999. Influence of renal biomarker variability on the design and interpretation of occupational or environmental studies. *Toxicol Lett* 106(1):69-77.
- Stengel B, Billon S, Van Dijk PC, Jager KJ, Dekker FW, Simpson K, Briggs JD. 2003. Trends in the incidence of renal replacement therapy for end-stage renal disease in Europe, 1990-1999. *Nephrol Dial Transplant* 18(9):1824-33.
- Stewart JH, Bucciante G, Agodoa L, Gellert R, McCredie MR, Lowenfels AB, Disney AP, Wolfe RA, Boyle P, Maisonneuve P. 2003. Cancers of the kidney and urinary tract in patients on dialysis for end-stage renal disease: analysis of data from the United States, Europe, and Australia and New Zealand. *J Am Soc Nephrol* 14(1):197-207.
- Stoev SD, Hald B, Mantle PG. 1998. Porcine nephropathy in Bulgaria: a progressive syndrome of complex or uncertain (mycotoxin) aetiology. *Vet Rec* 142(8):190-4.
- Stoev SD, Stefanov M, Denev S, Radic B, Domijan AM, Peraica M. 2004. Experimental mycotoxicosis in chickens induced by ochratoxin A and penicillic acid and intervention with natural plant extracts. *Vet Res Commun* 28(8):727-46.
- Stojanov IS, Stojchev, II, Nicolov IG, Draganov IV, Petkova-Bocharova TK, Chernozemsky IN. 1977. Cancer mortality in a region with endemic nephropathy. *Neoplasma* 24(6):625-32.
- Stojanov IS, Chernozemsky IN, Nicolov IG, Stoichev, II, Petkova-Bocharova TK. 1978. Epidemiologic association between endemic nephropathy and urinary system tumors in an endemic region. *J Chronic Dis* 31(12):721-4.
- Stojkovicacute, et al. 1984. High affinity binding of ochratoxin A to plasma constituents. *Biochemistry International* 9(1):33-38.
- Storen O, Holm H, Stormer FC. 1982. Metabolism of ochratoxin A by rats. *Appl Environ Microbiol* 44(4):785-9.
- Studer-Rohr I, Schlatter J, Dietrich DR. 2000. Kinetic parameters and intraindividual fluctuations of ochratoxin A plasma levels in humans. *Arch Toxicol* 74(9):499-510.
- Tahina Project. 2005. Epidemiological Transition And Health Impact in North Africa. <<http://mpl.ird.fr/tahina/>>.
- Tanchev Y, Dorossiev D. 1991. The first clinical description of Balkan endemic nephropathy (1956) and its validity 35 years later. *IARC Sci Publ*(115):21-8.
- Tarasuk V, Beaton GH. 1992. Statistical estimation of dietary parameters: implications of patterns in within-subject variation--a case study of sampling strategies. *Am J Clin Nutr* 55(1):22-7.
- Tatu et al.. 1998. The etiology of Balkan Endemic Nephropathy: still more question than answers. *Environmental Health Perspectives* 106(11):689-700.

- Taylor, al. e. 1997. The assessment of biomarkers to detect nephrotoxicity using an integrated database. *Environmental Research* 75:23-33.
- Teren J, Varga J, Hamari Z, Rinyu E, Kevei F. 1996. Immunochemical detection of ochratoxin A in black *Aspergillus* strains. *Mycopathologia* 134(3):171-6.
- Thiele S. and Weiss C. (2000) Variation delectate: consumer demand for food diversity. In: 71th EAAE Seminar – The Food Consumer in the Early 21st Century – Contributed Paper.
- Thuvander A, Paulsen JE, Axberg K, Johansson N, Vidnes A, Enghardt-Barbieri H, Trygg K, Lund-Larsen K, Jahrl S, Widenfalk A and others. 2001. Levels of ochratoxin A in blood from Norwegian and Swedish blood donors and their possible correlation with food consumption. *Food and Chemical Toxicology* 39:1145-1151.
- Toncheva D, Dimitrov T, Tzoneva M. 1988. Cytogenetic studies in Balkan endemic nephropathy. *Nephron* 48(1):18-21.
- Toncheva D, Dimitrov T. 1996. Genetic predisposition to Balkan endemic nephropathy. *Nephron* 72(4):564-9.
- Toncheva D, Dimitrov T, Stojanova S. 1998. Etiology of Balkan endemic nephropathy: a multifactorial disease? *Eur J Epidemiol* 14(4):389-94.
- Tressou J, Leblanc J, Feinberg M, Bertail P. 2004. Statistical methodology to evaluate food exposure to a contaminant and influence of sanitary limits: application to Ochratoxin A. *Regul Toxicol Pharmacol* 40(3):252-63.
- Tressou J. 2005. Non parametric modelling of the left censorship of analytical data in food risk exposure assessment. Submitted.
- U.S. Renal Data System. 2004. *USRDS 2004 Annual Data Report*. Bethesda, MD.
- Ueno Y, Maki S, Lin J, Furuya M, Sugiura Y, Kawamura O. 1998. A 4-year study of plasma ochratoxin A in a selected population in Tokyo by immunoassay and immunoaffinity column-linked HPLC. *Food Chem Toxicol* 36(5):445-9.
- Usami T, Koyama K, Takeuchi O, Morozumi K, Kimura G. 2000. Regional variations in the incidence of end-stage renal failure in Japan. *Jama* 284(20):2622-4.
- Vadiaka M, Sotsiou F, Koufos C. 1998. A case of systemic karyomegaly associated with interstitial nephritis. *Ann Med Interne (Paris)* 149(5):291-4.
- Valenta H. 1998. Chromatic methods for the determination of ochratoxin A in animal and human tissues and fluids. *Journal of Chromatography A* 815:75-92.
- van den Brandt P, Voorrips L, Hertz-Picciotto I, Shuker D, Boeing H, Speijers G, Guittard C, Kleiner J, Knowles M, Wolk A and others. 2002. The contribution of epidemiology. *Food Chem Toxicol* 40(2-3):387-424.
- van der Merwe KJ, Steyn PS, Fourie L, Scott DB, Theron JJ. 1965. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature* 205(976):1112-3.
- van Egmond H.P., Speijers G.J.A. 1994. Survey of data on the incidence and levels of Ochratoxin A in food and animal feed worldwide. *Journal of Natural Toxins* 3:125-144.
- van Rensburg SJ, van Schalkwyk GC, van Schalkwyk DJ. 1990. Primary liver cancer and aflatoxin intake in Transkei. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 10(1-2):11-6.
- Vergier P., Volatier J.-L., Dufour A. 1999. Estimation des niveaux théoriques d'ingestion d'aflatoxines et d'ochratoxine. In: Pfohl-Leskowicz A., editor. *Les mycotoxines dans l'alimentation: évaluation et gestion du risque*. Paris: Tec&Doc, Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France (CSHPF), Section de l'Alimentation et de la Nutrition. p 371-384.

- Viberti, al. e. 1982. Microalbuminuria as predictor of clinical nephropathy in insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* 1:1430-1432.
- Vineis P. 1997. Sources of variation in biomarkers. *IARC Sci Publ*(142):59-71.
- Volatier J.-L. 2000. Enquête INCA individuelle et nationale sur les consommations alimentaires. Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA), editor. Paris: Tech&Doc. 192 p.
- Volatier JL, Turrini A, Welten D. 2002. Some statistical aspects of food intake assessment. *Eur J Clin Nutr* 56 Suppl 2:S46-52.
- Vose D. 2000. Risk Analysis: a quantitative guide. Second Edition. Chichester, England: John Wiley & Sons Ltd. 432 p.
- 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(6):2483-8.
- Vrabcheva T, Petkova-Bocharova T, Grosso F, Nikolov I, Chernozemsky IN, Castegnaro M, Dragacci S. 2004. Analysis of ochratoxin A in foods consumed by inhabitants from an area with balkan endemic nephropathy: a 1 month follow-up study. *J Agric Food Chem* 52(8):2404-10.
- Wafa EW. 1998. Human ochratoxicosis and nephropathy in Egypt: a preliminary study. *Human and Experimental Toxicology* 17:124-129.
- Wang JS, Huang T, Su J, Liang F, Wei Z, Liang Y, Luo H, Kuang SY, Qian GS, Sun G and others. 2001. Hepatocellular carcinoma and aflatoxin exposure in Zhuqing Village, Fusui County, People's Republic of China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10(2):143-6.
- Watts GF, Morris RW, Khan K, Polak A. 1988. Urinary albumin excretion in healthy adult subjects: reference values and some factors affecting their interpretation. *Clin Chim Acta* 172(2-3):191-8.
- Watts GF, Vlitos MA, Morris RW, Price RG. 1988. Urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase excretion in insulin-dependent diabetes mellitus: relation to microalbuminuria, retinopathy and glycaemic control. *Diabete Metab* 14(5):653-8.
- Watts GF, Powell M, Rowe DJ, Shaw KM. 1989. Low-molecular-weight proteinuria in insulin-dependent diabetes mellitus: a study of the urinary excretion of beta 2-microglobulin and retinol-binding protein in alkalinized patients with and without microalbuminuria. *Diabetes Res* 12(1):31-6.
- Whitaker TB. 2003. Detecting mycotoxins in agricultural commodities. *Mol Biotechnol* 23(1):61-71.
- White S, Cass A, Atkins R, Chadban S. 2005. Chronic kidney disease in the general population. *Advances in Chronic Kidney Disease* 12(1):5-13.
- Whiting PH, Ross IS, Borthwick L. 1979. Serum and urine N-acetyl-beta-D-glucosaminidase in diabetics on diagnosis and subsequent treatment, and stable insulin dependent diabetics. *Clin Chim Acta* 92(3):459-63.
- Whiting PH, Ross IS, Borthwick LJ. 1983. N-Acetyl-beta-D-glucosaminidase levels and the onset of diabetic microangiopathy. *Ann Clin Biochem* 20 Pt 1:15-9.
- WHO. 1965. Memorandum. The endemic nephropathy of South-Eastern Europe. *Bulletin of the World Health Organization* 32:441-8.
- WHO. 1991. Evaluation of certain food additives and contaminants. 37th Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives JECFA. Geneva. 806, and corrigenda.
- WHO. 1995. Evaluation of certain food additives and contaminants. 44th Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives JECFA. Geneva. 859 p.

- WHO. 1997. Evaluation of certain food additives and contaminants. 49th Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives JECFA. Geneva. 884 p.
- WHO. 2002. Evaluation of certain mycotoxins in food. 56<sup>th</sup> Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives JECFA. Geneva. 906, 27-35 p.
- WHO. 2004. Evaluation of certain food additives and contaminants. 61st Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives JECFA. Geneva. 52 p.
- Wild CP, Jansen LA, Cova L, Montesano R. 1993. Molecular dosimetry of aflatoxin exposure: contribution to understanding the multifactorial etiopathogenesis of primary hepatocellular carcinoma with particular reference to hepatitis B virus. *Environ Health Perspect* 99:115-22.
- Wild CP, Hall AJ. 2000. Primary prevention of hepatocellular carcinoma in developing countries. *Mutat Res* 462(2-3):381-93.
- Willett W. 1998. Nutritional epidemiology. Oxford University Press. New York. 514 p.
- Willett W. 1998. Nature of variation in diet. Nutritional epidemiology. Monographs in epidemiology and biostatistics. Second Edition: Oxford University Press. New York. p 33-49.
- Xiao H, Madhyastha S, Marquardt RR, Li S, Vodela JK, Frohlich AA, Kemppainen BW. 1996. Toxicity of ochratoxin A, its opened lactone form and several of its analogs: structure-activity relationships. *Toxicol Appl Pharmacol* 137(2):182-92.
- Yamagata K, Takahashi H, Suzuki S, Mase K, Hagiwara M, Shimizu Y, Hirayama K, Kobayashi M, Narita M, Koyama A. 2004. Age distribution and yearly changes in the incidence of ESRD in Japan. *American Journal of Kidney Disease* 43(3):433-443.
- Yeh FS, Yu MC, Mo CC, Luo S, Tong MJ, Henderson BE. 1989. Hepatitis B virus, aflatoxins, and hepatocellular carcinoma in southern Guangxi, China. *Cancer Res* 49(9):2506-9.
- Yuen CT, Price RG, Chattagoon L, Richardson AC, Prall PF. 1982. Colorimetric assays for N-acetyl-beta-D-glucosaminidase and beta-D-galactosidase in human urine using newly-developed omega-nitrostyryl substrates. *Clin Chim Acta* 124(2):195-204.
- Yuen CT, Kind PR, Price RG, Prall PF, Richardson AC. 1984. Colorimetric assay for N-acetyl-beta-D-glucosaminidase (NAG) in pathological urine using the omega-nitrostyryl substrate: the development of a kit and the comparison of manual procedure with the automated fluorimetric method. *Ann Clin Biochem* 21 (Pt 4):295-300.
- Zepnik H, Volkel W, Dekant W. 2003. Toxicokinetics of the mycotoxin ochratoxin A in F 344 rats after oral administration. *Toxicol Appl Pharmacol* 192(1):36-44.
- Zimmerli B, Dick R. 1995. Determination of ochratoxin A at the ppt level in human blood, serum, milk and some foodstuffs by high-performance liquid chromatography with enhanced fluorescence detection and immunoaffinity column cleanup: methodology and Swiss data. *J Chromatogr B Biomed Appl* 666(1):85-99.
- Zingerle M, Silbernagl S, Gekle M. 1997. Reabsorption of the nephrotoxin ochratoxin A along the rat nephron in vivo. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 280(1):220-224.

## ANNEXE 1

INCIDENCE DECENNALE (TI) ET INTERVALLE DE CONFIANCE A 95% (IC95%)  
IRCT par tranche d'âge, par pathologie primaire  
et par région de prise en charge selon le sexe

Caractéristique des patients		Taux d'Incidence IRC traitée (pmh)					
		Hommes		Femmes		Tous	
		TI	IC95%	TI	IC95%	TI	IC95%
<b>Âge<sup>a</sup></b> (années)	00-19	12.2	[10.7 ; 13.7]	8.9	[7.6 ; 10.2]	10.6	[9.6 ; 11.6]
	20-44	67.6	[63.7 ; 71.5]	46.0	[42.8 ; 49.2]	56.8	[54.2 ; 59.3]
	45-64	261.9	[248.8 ; 275.0]	187.5	[176.5 ; 198.5]	224.4	[215.8 ; 232.9]
	65-74	332.9	[306.0 ; 359.8]	315.3	[288.4 ; 342.2]	324.3	[305.3 ; 343.4]
	75+	176.0	[148.8 ; 203.2]	143.8	[118.1 ; 169.5]	160.6	[141.9 ; 179.4]
<b>Pathologie Primaire<sup>a</sup></b>	NG	10.7	[9.7 ; 11.6]	7.6	[6.8 ; 8.4]	9.2	[8.5 ; 9.8]
	PKR	1.5	[1.1 ; 1.8]	1.2	[0.9 ; 1.5]	1.3	[1.1 ; 1.6]
	NV	13.7	[12.6 ; 14.7]	10.6	[9.6 ; 11.5]	12.1	[11.4 ; 12.8]
	Ndiabétique	16.6	[15.4 ; 17.8]	8.2	[7.4 ; 9.1]	12.5	[11.7 ; 13.2]
	NIC	9.3	[8.4 ; 10.2]	8.8	[7.9 ; 9.7]	9.1	[8.4 ; 9.7]
	NICI	4.7	[4.1 ; 5.4]	5.8	[5.1 ; 6.5]	5.3	[4.8 ; 5.7]
	Inconnue	21.1	[19.8 ; 22.5]	19.3	[18.0 ; 20.6]	20.2	[19.3 ; 21.1]
<b>Région<sup>b</sup></b>	N-O	49.4	[48.6 ; 50.2]	43.7	[43.0 ; 44.4]	46.6	[46.1 ; 47.1]
	N-E	58.8	[57.9 ; 59.6]	49.7	[48.9 ; 50.4]	54.2	[53.6 ; 54.8]
	C-O	36.3	[35.6 ; 36.9]	30.3	[29.7 ; 31.0]	33.3	[32.8 ; 33.8]
	C-E	103.1	[102.2 ; 104.0]	70.5	[69.7 ; 71.2]	87.0	[86.4 ; 87.6]
	S-O	77.8	[76.2 ; 79.3]	58.9	[57.6 ; 60.3]	68.5	[67.5 ; 69.5]
	S-E	87.2	[85.9 ; 88.5]	61.0	[59.9 ; 62.0]	74.2	[73.4 ; 75.0]
	Tunis	115.9	[114.9 ; 116.8]	88.0	[87.1 ; 88.9]	102.1	[101.5 ; 102.7]

a : taux bruts ; b : taux ajustés sur l'âge (hommes et femmes) et le sexe (tous), population de référence : Tunisie 1992-2001.

## ANNEXES 2-3-4

### QUESTIONNAIRES DU PROTOCOLE OTARI:

Annexe2: Questionnaire inclusion et médical

Annexe 3: Questionnaire socio-professionnel et habitudes de vie

Annexe 4: Questionnaire de fréquence et d'habitudes alimentaires



OTARI  
ENQUÊTE PILOTE  
Juin 2004



Questionnaire  
Inclusion & Médical

(à remplir par un médecin-enquêteur)

Prénom de la personne à enquêter | \_\_\_\_\_ |

Numéro du ménage ..... | \_ | \_ | \_ | \_ |  
 Numéro de la personne dans le ménage | \_ | \_ |  
 Numéro de l'enquêteur ..... | \_ | \_ |  
 Date de la visite (jj/mm).... | \_ | \_ | / | \_ | \_ |

La zone ci-dessous sera détruite après remplissage



Nom de l'ENQUÊTEUR .....  
 Nom du FOYER .....  
 Prénom de l'ENQUÊTÉ(E) .....



A- Inclusion et consentement

A1. Informations générales

A11. Quel est le sexe la personne enquêtée ?  
 - Homme ..... 1  
 - Femme ..... 2

A12. Quel est votre âge (en années révolues) | \_ | \_ | ans  
 Personne est âgée entre 20 et 79 ans  
 - Oui ..... 1 **Aller à A13**  
 - Non ..... 2 **Aller à A5**  
 - Refuse de répondre ..... 3

A13. Depuis combien d'années habitez-vous dans le district de ..... ? | \_ | \_ | ans  
 Personne habitant dans la région depuis 5 ans ou plus  
 - Oui ..... 1 **Aller à A14**  
 - Non ..... 2 **Aller à A5**  
 - Refuse de répondre ..... 3

A2. Informations médicales

A21. Un médecin vous a-t-il déjà dit que vous aviez du sucre dans le sang ou les urines, c'est-à-dire que vous aviez un diabète ?  
 - Oui ..... 1 **Aller à A5**  
 - Non ..... 2 **Aller à A22**  
 - Refuse de répondre ..... 3 **Aller à A5**

A22. Dans les 6 mois qui précèdent l'enquête, un médecin vous a-t-il déjà dit que vous aviez une infection de l'appareil urinaire ?  
 Ex : infection urinaire (pyélonéphrite, cystite, prostatite)  
 - Oui ..... 1 **Aller à A5**  
 - Non ..... 2 **Aller à A23**  
 - Refuse de répondre ..... 3 **Aller à A5**

A23. Dans les 6 mois qui précèdent l'enquête, un médecin vous a-t-il déjà dit que vous aviez une maladie des reins ou de l'appareil urinaire ?  
 Ex : adénome de la prostate, calculs urinaires, insuffisance rénale, autre  
 - Oui ..... 1 **Aller à A24**  
 - Non ..... 2 **Aller à A28**  
 - Refuse de répondre ..... 3 **Aller à A5**

A24. Quel est le nom de cette maladie (maladie des reins ou de l'appareil urinaire) ?

Remarque : l'enquêteur aide la personne à nommer l'affection.

L'affection est une :  
 - néphrite interstitielle ..... 1  
 - néphrite tubulo-interstitielle ..... 2 **Aller à A25**  
 - insuffisance rénale chronique de cause néphrite -interstitielle ..... 3  
 - insuffisance rénale chronique de cause indéterminée ..... 4  
 - autre cause ou ne sait pas ..... 5  
 - Refuse de répondre ..... 6 **Aller à A5**

A25. À quelle date a-t-elle été découverte ? (mm/aaaa) ..... | \_ | \_ | / | \_ | \_ |

A26. Suivez-vous un traitement, à la maison, à l'hôpital ou dans un centre de santé (CSB, centre de dialyse), pour cette affection ?  
 - Oui ..... 1 **Aller à A27**  
 - Non ..... 2 **Aller à A28**  
 - Refuse de répondre ..... 3

A27. Quel traitement suivez-vous pour cette affection (médicaments, séances de dialyse, autre) ?

Remarque : l'enquêteur aide la personne à nommer le traitement.

.....  
 .....

A28. Dans le passé (au de-là des 6 derniers mois), un médecin vous a-t-il déjà dit que vous aviez une maladie des reins ou de l'appareil urinaire ?

Ex : adénome de la prostate, calculs urinaires, insuffisance rénale, autre

Nom de la maladie*	Date de découverte (mm/aaaa)
- Oui ..... 1	_   _   /   _   _
- Non ..... 2	
- Refuse de répondre ..... 3	

**Aller à A3**

\* : l'enquêteur aide la personne à nommer l'affection.

A29. Suivez-vous actuellement un traitement, à la maison, à l'hôpital ou dans un centre de santé (CSB, centre de dialyse), pour cette affection ? Lequel ?

Type de traitement

Oui ..... 1 .....  
 Non ..... 2 **Aller à A3**  
 - Refuse de répondre ..... 3

A3. Questions concernant uniquement les femmes

Si la personne interrogée est une femme, poser les questions A31 et A32, sinon passer à la question A4.

A31. Êtes-vous actuellement enceinte ?  
 - Oui ..... 1 **Aller à A5**  
 - Non ..... 2 **Aller à A32**  
 - Refuse de répondre ..... 3 **Aller à A5**

A32. Êtes-vous en période de menstruation ?  
 - Oui ..... 1 **Aller à A5**  
 - Non ..... 2 **Aller à A4**  
 - Refuse de répondre ..... 3 **Aller à A5**

A4. Consentement à participer à la recherche

Remarque : l'enquêteur explique en détail les objectifs, les modalités et le déroulement de l'étude. Il répond aux questions de la personne avant de solliciter et de recueillir son consentement.

Accepteriez-vous de participer à l'étude épidémiologique qui vient de vous être présentée par le médecin-enquêteur ?  
 - Oui ..... 1 **Faire signer le consentement et aller à B1**  
 - Non ..... 2 **Interrompre l'interview**

A5. Non inclusion dans l'étude

L'enquêteur explique à la personne pourquoi elle ne peut pas participer à la recherche (cf. la réponse qui a renvoyé l'enquêteur à ce paragraphe) et la remercie pour sa disponibilité.

## B- Données anthropométriques

B1. Quelle est votre taille ? ..... | | m | | | cm

B2. Quel est votre poids ? ..... | | | | kg

B3. Le médecin enquêteur prend la tension artérielle de la personne selon les indications fournies :

(ex : pression artérielle systolique=12 ; pression artérielle diastolique=7 : | 1 | 2 | . | 0 | 7 | )  
Tension artérielle au repos : | | | . | | | |

## C- État de santé et antécédents familiaux

C0. Bénéficiez-vous d'une affiliation à un régime de sécurité sociale (assurance maladie) ?

Oui, via la Caisse Nationale de Retraite et de Prévoyance Sociale (CNRPS : fonctionnaires du secteur public) ..... 1  
Oui, via la Caisse Nationale de Sécurité Sociale (CNSS : salariés du secteur privé) ..... 2  
Oui, via la Caisse des Indigents (CI) ..... 3  
Oui, via un autre régime (préciser) : ..... 4  
Non, ne bénéficie d'aucune affiliation à la sécurité sociale ..... 5

C1. Un médecin vous a-t-il déjà dit que vous aviez une pression artérielle élevée, c'est-à-dire que vous aviez une hypertension artérielle ?

- Oui ..... 1 **Aller à C2**  
- Non ..... 2 **Aller à C5**  
- Refuse de répondre ..... 3

C2. À quelle date a-t-elle été découverte ? (mm/aaaa) ..... | | | | / | | | |

C3. Suivez-vous un traitement pour cette hypertension artérielle ?

- Oui ..... 1 **Aller à C4**  
- Non ..... 2 **Aller à C5**  
- Refuse de répondre ..... 3

C4. Quel traitement suivez-vous pour cette affection (médicaments, régime alimentaire, etc.) et depuis combien de temps ?

Remarque : l'enquêteur aide la personne à nommer le traitement.

C5. Un médecin vous a-t-il déjà dit que vous aviez une autre maladie que celles évoquées précédemment ?

- Oui ..... 1 **Aller à C6**  
- Non ..... 2 **Aller à C8**  
- Refuse de répondre ..... 3

C6. Quel est le nom de cette maladie ?

Remarque : l'enquêteur aide la personne à nommer l'affection.

C7. À quelle date a-t-elle été découverte ? (mm/aaaa) ..... | | | | / | | | |

C8. À votre connaissance, un médecin a-t-il diagnostiqué chez un membre de votre famille une maladie des reins ?

- Oui ..... 1 **Aller à C9**  
- Non ..... 2 **Aller à D1**  
- Refuse de répondre ..... 3

C9. Quels sont vos liens de parenté avec cette personne ainsi que le nom de la maladie ?

Parenté (entourer)	Nom de la maladie
Père ..... 1	.....
Mère ..... 2	.....
Fils ..... 3	.....
Fille(s) ..... 4	.....
Frère(s) ..... 5	.....
Sœur(s) ..... 6	.....
Parent du 2 <sup>ème</sup> degré* ..... 7	.....

\* : grands-parents, oncles, tantes ou cousin(e)s

## D- Consommation de médicaments néphrotoxiques courants

D1. Prenez-vous actuellement ou avez-vous pris des médicaments contre la douleur ?

Prenez-vous actuellement ou avez-vous pris au cours des dix dernières années de façon régulière (au moins 3 fois par semaine pendant 3 mois) des médicaments contre la douleur pour des maux de tête, des rhumatismes, des douleurs dentaires, les règles, ou autre ?

- Oui ..... 1 **Aller à D2**  
- Non ..... 2 **Aller à E**  
- Refuse de répondre ..... 3

D2. Quelle est votre consommation de médicaments contre la douleur ?

Indiquez les médicaments contre la douleur que vous prenez actuellement ou que avez-vous pris au cours des dix dernières années de façon régulière (au moins 3 fois par semaine pendant 3 mois)

	Nombre d'unités par semaine	Combien de temps au total
<b>D21. Analgésiques à base de Phénacétine</b> Ex : LAMALINE	-Oui ..... 1         cachets/sachets	 années mois
	-Non ..... 2	<b>Aller à D22</b>
<b>D22. Analgésiques à base de Paracétamoanalon</b> Ex : DIALGESAL, DIANTALVIC, ADOL, IDARAC	-Oui ..... 1         cachets/sachets	 années mois
	-Non ..... 2	<b>Aller à D23</b>
<b>D23. Anti-inflammatoires non stéroïdiens</b> Ex : FELDENE, FLEXEN, INDOCID, PIROXICAM, PROFENID, ROXAM, VOLTARENE, XENID	-Oui ..... 1         cachets/sachets	 années mois
	-Non ..... 2	<b>Aller à D24</b>
<b>D24. Autres médicaments contre la douleur</b> (à préciser)	-Oui ..... 1         cachets/sachets	 années mois
	-Non ..... 2	<b>Aller à E</b>

## E- Remerciements et suites de l'enquête

L'enquêteur remercie la personne pour sa participation et lui explique la suite du déroulement de l'étude :

- Nature et modalités des prélèvements biologiques ;
- Nature et modalités des prélèvements alimentaires ;
- Autres questions qui seront posées (socio-démographiques, habitudes de vie, habitudes alimentaires et questionnaire de fréquence alimentaire) ;

L'enquêteur indique à chaque fois PAR QUI et QUAND, en accord avec la personne, ces prélèvements et les questionnaires seront recueillis, s'il n'est pas prévu qu'il le fasse lui-même.



OTARI  
ENQUÊTE PILOTE  
Juin 2004



Questionnaire  
Socioprofessionnel &  
Habitudes de vie

Prénom de la personne à enquêter | \_\_\_\_\_ |

Numéro du ménage ..... | | | | |

Numéro de la personne dans le ménage | | | |

Numéro de l'enquêteur ..... | | | |

Date de la visite (jj/mm).... | | | | / | | | |

La zone ci-dessous sera détruite après remplissage

Nom de l'ENQUÊTEUR .....

Nom du FOYER .....

Prénom de l'ENQUÊTÉ(E) .....

A-bis- Situation socioprofessionnelle et instruction : ménage

Au cas où les autres membres du ménage, en particulier le chef de famille et les enfants ayant accès à l'instruction, n'ont pas inclus dans l'étude. L'enquêteur interroge la personne sur la situation professionnelle et l'instruction du chef de famille ou de l'enfant ayant le niveau d'instruction le plus avancé.

A1b. Quel est le sexe du chef de famille ? - Homme ..... 1  
- Femme ..... 2

A2b. Quelle est sa situation professionnelle actuelle ?

1	Occupe un emploi	1
2	Chômeur	2
3	Etudiant, élève, en formation, en stage non rémunéré	3
4	Retraité(e) (ancien salarié) ou préretraité(e)	4
5	Retiré(e) des affaires (ancien agriculteur, ancien artisan, ancien commerçant...)	5
6	Femme ou homme au foyer	6
7	Autre inactif (y compris les titulaires d'une pension de réversion ou invalide)	7
8	Refuse de répondre	8

A3b. A-t-il (elle) déjà exercé une profession ? - Oui ..... 1  
- Non ..... 2  
- Refuse de répondre ..... 3

A4b. Était-il (elle) (est-il (elle)) ?

1	Actif sans travail	1
2	Ouvrier agricole (bâtiment, industrie)	2
3	Exploitant agricole	3
4	Ouvrier non agricole	4
5	Cadre et profession libérale moyen	5
6	Cadre et profession libérale supérieur	6
7	Autre employé	7
8	Patron des petits métiers dans l'industrie, commerce et services	8
9	Artisan ou indépendant dans l'industrie, commerce & services	9
10	Refuse de répondre	10

A5b. Quel est son niveau d'instruction ?

1	Aucun, n'a jamais été scolarisé, n'a jamais appris à lire et écrire	1
2	N'a jamais été scolarisé mais a appris à lire et écrire	2
3	S'est arrêté à l'école primaire (enseignement de base)	3
4	S'est arrêté au secondaire, avant le baccalauréat	4
5	S'est arrêté au secondaire, au niveau du baccalauréat	5
6	A suivi une formation professionnelle	6
7	A entamé des études supérieures (université, institut supérieur d'études technologiques, école d'ingénieur, autre)	7
8	Autre (préciser) :	8
9	Refuse de répondre	9

A- Situation socioprofessionnelle et instruction : participant

A1. Quel est le sexe de la personne enquêtée ? - Homme ..... 1  
- Femme ..... 2

A2. Quel est votre âge (en années révolues) | | | ans

A3. Quelle est votre situation professionnelle actuelle ?

1	Occupe un emploi	1
2	Chômeur	2
3	Etudiant, élève, en formation, en stage non rémunéré	3
4	Retraité(e) (ancien salarié) ou préretraité(e)	4
5	Retiré(e) des affaires (ancien agriculteur, ancien artisan, ancien commerçant...)	5
6	Femme ou homme au foyer	6
7	Autre inactif (y compris les titulaires d'une pension de réversion ou invalide)	7
8	Refuse de répondre	8

A4. Avez-vous déjà exercé une profession ? - Oui ..... 1  
- Non ..... 2  
- Refuse de répondre ..... 3

A5. Êtes-vous (étiez-vous) ?

1	Actif sans travail	1
2	Ouvrier agricole	2
3	Exploitant agricole	3
4	Ouvrier non agricole (bâtiment, industrie)	4
5	Cadre et profession libérale moyen	5
6	Cadre et profession libérale supérieur	6
7	Autre employé	7
8	Patron des petits métiers dans l'industrie, commerce et services	8
9	Artisan ou indépendant dans l'industrie, commerce & services	9
10	Refuse de répondre	10

A6. Quel est votre niveau d'instruction ?

1	Aucun, vous n'avez jamais été scolarisé, vous n'avez jamais appris à lire et écrire	1
2	Vous n'avez jamais été scolarisé mais vous avez appris à lire et écrire	2
3	Votre scolarité s'est arrêtée à l'école primaire (enseignement de base)	3
4	Votre scolarité s'est arrêtée au secondaire, avant le baccalauréat	4
5	Votre scolarité s'est arrêtée au secondaire, au niveau du baccalauréat	5
6	Vous avez suivi une formation professionnelle	6
7	Vous avez entamé des études supérieures (université, institut supérieur d'études technologiques, école d'ingénieur, autre)	7
8	Autre (préciser) :	8
9	Refuse de répondre	9

B- Consommation de tabac

B1. Est-ce que vous fumez, même de temps en temps ? Diriez-vous ...

1	Oui, vous fumez quotidiennement	1
2	Oui, vous fumez occasionnellement	2
3	Non, vous ne fumez pas mais vous avez déjà fumé	3
4	Non, vous ne fumez pas et vous n'avez jamais fumé	4
5	Refuse de répondre	5

B2. Combien de ... fumez-vous (fumiez-vous) ?

pipe à eau	/jour	/semaine
cigarettes	/jour	/semaine
neffa (tabac à priser)	/jour	/semaine
cigares/cigarillos	/jour	/semaine

B3. A quel âge avez-vous commencé ? | | | ans

B4. Si vous avez arrêté définitivement, à quel âge avez-vous arrêté ? | | | ans

C- Utilisation de produits de beauté traditionnels

C1. Vous arrive-t-il d'utiliser du crayon khôl pour le maquillage des yeux ? - Oui ..... 1  
- Non ..... 2  
- Refuse de répondre ..... 3

C2. À quelle fréquence utilisez-vous du crayon khôl ?

1	Quotidiennement	1
2	Plusieurs fois par semaine	2
3	Plusieurs fois par mois	3
4	Occasionnellement	4
5	Refuse de répondre	5

C3. Vous arrive-t-il d'utiliser du mardouma pour la teinture ou le soin des cheveux ? - Oui ..... 1  
- Non ..... 2  
- Refuse de répondre ..... 3

C4. À quelle fréquence utilisez-vous du mardouma ?

1	..... fois par semaine	1
2	..... fois par mois	2
3	Occasionnellement	3
4	Refuse de répondre	4

C5. L'enquêteur remercie la personne et passe au questionnaire alimentaire.





## ANNEXE 5

### FICHES TECHNIQUES DU PROTOCOLE OTARI:

Check-list médecin  
Check-list infirmier  
Nomenclature OTARI  
Prélèvement de sang  
Mesure de la taille, du poids et de la tension artérielle  
Instructions aux participants pour le recueil des urines  
Urines: recolte, analyse sur place, fiche de prélèvement  
Choix et prélèvement des items alimentaires  
Liste des aliments composés tunisiens comprenant des ingrédients  
vecteurs d'OTA

Check-list pour les visites aux participants : MÉDECIN

**Première visite**

- 1- Présenter l'étude à tous les membres du ménage réunis ;
- 2- Passer le « **Questionnaire d'inclusion et médical** » (questions A11 à A32) à l'une des personnes du ménage ;

LES QUESTIONNAIRES SONT REMPLIS EN FRANÇAIS EN S'ASSURANT DE LA LISIBILITÉ DES RÉPONSES

- 3- Si les critères d'inclusion sont remplis, exposer tous les aspects et étapes de l'étude :
  - Nature de la recherche : recherche biomédicale sur les liens entre alimentation et santé (maladies des reins) ;
  - Durée de participation : 2 jours (2 visites de chacune 30min à 1h) ;
  - Méthode utilisée : des enquêteurs vous posent des questions à partir de trois questionnaires : inclusion et médical, socioprofessionnel et habitudes de vie, fréquence et habitudes alimentaires et prélèvent un échantillon de sang (10ml), un échantillon d'urines (50ml) et de deux échantillons d'aliments (100g chacun) ;
  - Conditions de l'essai : un médecin et un infirmier vous rendent visite 2 jours de suite selon un RDV fixé avec vous ;
  - Contraintes de cette recherche : accorder environ 1h pour le remplissage des questionnaires avec les enquêteurs et fournir les échantillons biologiques et alimentaires nécessaires ;
  - Risques prévisibles : aucun ;
- 4- Répondre aux questions de la personne, puis solliciter son consentement. En cas de refus de participer, demander la cause et la noter ;
- 5- Continuer la passation du questionnaire avec les questions B à E ; pour les questions B1 à B3, se référer aux procédures de la fiche « **Mesure de la taille, du poids et de la tension artérielle** » ;
- 6- Prendre le **RDV** pour le recueil du sang et des urines le lendemain matin et remettre le pot étiqueté destiné au recueil des urines ;
- 7- Donner les instructions au participant pour la récolte des urines le lendemain matin selon la fiche « **Instructions aux participants pour le recueil des urines** » ;
- 8- Expliquer que l'infirmier-enquêteur va poser des questions sur les habitudes de vie et les habitudes alimentaires ;
- 9- Recommencer à **2**, avec un autre membre du ménage.

**Seconde visite**

- 1- Récolter, étiqueter et analyser les urines selon la fiche « **Récolte, analyses sur place, fiche de prélèvement** » ; remplir les questions 1 à 5 de la « **Fiche de prélèvement et de suivi des urines** » ; les déposer sur glace ;
- 2- Compléter la « **Fiche de prélèvement et de suivi des urines** » ;
- 3- Recommencer à **1**, avec un autre participant du ménage.

Nomenclature OTARI

**Exemple**

Premier ménage enquêté (ménage n°1)  
Troisième personne enquêtée au sein du ménage (personne n°3)  
Enquêteur n°4

Libellé des questionnaires (page de garde) :

Numéro du ménage .....	0 1
Numéro de la personne dans le ménage .....	0 3
Numéro de l'enquêteur .....	0 4
Date de la visite (jj/mm) .....	2 5 / 0 6

En suivant l'ordre de ces trois informations, l'identifiant OTARI individuel de la personne enquêtée est le suivant : **01 03 04**.

**Étiquetage des échantillons**

Sang et sérum  
Un S est ajouté en préfixe : **S010304**.

Urines  
Un U est ajouté en préfixe et le numéro de l'aliquot en suffixe : **U010304\_1** (\_1 pour aliquot n°1).

Aliments  
Seul le numéro du ménage est pris en compte, avec le suffixe C pour l'échantillon de céréales et A pour l'autre : **01C** et **01A**. Une étiquette comportant en toutes lettres la nature de l'aliment est également apposée.

**Dans tous les cas, la date du prélèvement est apposée en-dessous du code OTARI.**

Check-list pour les visites aux participants : INFIRMIER

**Première visite**

- 1- Faire passer le « **Questionnaire socio-professionnel et habitudes de vie** » :

LES QUESTIONNAIRES SONT REMPLIS EN FRANÇAIS EN S'ASSURANT DE LA LISIBILITÉ DES RÉPONSES

- 2- Faire passer le « **Questionnaire de fréquence et d'habitudes alimentaires** » en utilisant si nécessaire, lorsque la personne déclare des items non listés, les espaces réservés à « Autres » ;
- 3- Recommencer à **1**, avec un autre participant du ménage ;
- 4- Une fois que tous les membres du ménage inclus dans l'étude ont rempli le « **Questionnaire de fréquence et d'habitudes alimentaires** », suivre les instructions de la fiche « **Choix et prélèvement des items alimentaires** » pour identifier les deux aliments de base à prélever par ménage ;
- 5- Expliquer aux participants d'un même ménage que deux échantillons alimentaires vont être demandés au niveau du **ménage** : donner les **sacs étiquetés** pour la réalisation des prélèvements par la personne du ménage en charge de la cuisine et nommer les aliments sélectionnés.

**Seconde visite**

1. Collecter les échantillons alimentaires du ménage en apposant immédiatement sur chaque sac, en plus de l'étiquette OTARI préalablement collée, le nom de l'aliment effectivement prélevé ;
2. Réaliser le prélèvement de sang selon la fiche « **Prélèvement de sang** » ;
3. Recommencer à **2**, avec un autre participant du ménage.

Prélèvement de sang

1. Coller les **étiquettes individuelles OTARI** sur les tubes avant tout prélèvement ;
2. Désinfecter le site de prélèvement (le plus distal possible afin de préserver le capital veineux du bras) avec de l'alcool à 70°C, laisser sécher ;
3. Prélever 2 tubes de sang (2\*5ml) ;
4. Apposer le pansement :  
**NB : La pose du garrot est la plus brève possible afin de limiter les risques d'hémolyse (inférieure à deux minutes).**
5. Homogénéiser les échantillons sans les agiter trop brutalement, ce qui favoriserait aussi l'hémolyse ;
6. Les tubes correctement étiquetés sont laissés 30min, environ à température ambiante sur un portoir pour assurer la coagulation complète (formation complète du caillot) ;
7. Les tubes coagulés sont alors rassemblés et conservés dans une glacière à +4°C ; ils doivent rester à cette température au minimum 1 à 2h avant d'être centrifugés (1000rpm, 10min) au local-laboratoire de Bou Salem.

## Mesure de la taille, du poids et de la tension artérielle

Les mesures de la taille et du poids sont effectuées sans chaussures, ni veste et poches vidées.

### Taille

1. Le sujet est debout, se tenant droit, les talons joints, les bras relâchés le long du corps et regarde droit devant lui ;
2. La mesure est effectuée et notée sur le questionnaire individuel avec 0.5 cm de précision.

### Poids

Le pèse-personne est taré une fois par semaine, étalonné au début de l'étude, reposant sur une surface dure, plane et propre. Il est nettoyé quotidiennement.

1. Faire monter le sujet sur la balance, au centre de celle-ci, pieds joints, son poids également réparti sur ses deux pieds. Le sujet doit rester immobile et regarder devant lui ;
2. Lire la mesure après stabilisation de l'aiguille et reporter celle-ci en kg sur le questionnaire avec 500 g de précision. Le sujet ne devra pas lire sa mesure lui-même.

### Tension artérielle

#### PRÉPARATION

On demandera au sujet d'éviter les exercices fatigants, la consommation de tabac, et la prise de médicaments susceptibles d'affecter le niveau tensionnel, au moins une heure avant la mesure de la pression artérielle.

La mesure devra avoir lieu après **5 minutes de repos** dans un environnement tranquille.

Le sujet doit être détendu, **en position assise**. Le bras gauche est accoudé sur un support confortable, le pli du coude à la hauteur du cœur. Le bras est relâché.

Le sujet a par ailleurs été informé de la procédure de mesure.

#### PROCÉDURE

1. Le sujet doit être en position assise ;
2. Le bras gauche, accoudé sur un support confortable, est utilisé pour la mesure ;
3. Positionner le centre de la partie gonflable du brassard en regard de l'artère humérale à deux ou trois centimètres du pli du coude ; ne pas trop serrer le brassard afin de ne pas comprimer le bras. Le haut du brassard ne doit pas être en contact avec le vêtement ;
4. Gonfler le brassard et effectuer la mesure ;
5. Une fois le brassard parfaitement dégonflé, élever le bras du sujet 5 secondes, attendre alors 2-3 minutes, puis renouveler la mesure de pression artérielle selon les modalités précédentes **sans avoir informé le sujet du résultat de la première mesure** ;
6. Les mesures sont notées immédiatement sur le questionnaire individuel.

**Note importante** : lorsqu'il existe un écart supérieur à 10 mm Hg entre les deux mesures (soit pour la tension systolique, soit pour la tension diastolique), les deux mesures sont répétées et le deuxième couplet de mesures est noté.

## Instructions aux participants pour le recueil des urines

Nous allons vous demander de récolter demain matin une partie de vos secondes urines du matin. Par **secondes urines**, nous voulons dire que vous devez, au moment où vous vous levez le matin, uriner comme d'habitude, mais que lors de votre second passage aux toilettes, nous vous demandons de récolter une partie de vos urines dans un pot que nous allons maintenant vous donner.

Nous vous remettons un flacon stérile avec votre **prénom** indiqué au feutre (pour éviter la confusion des pots avec les autres personnes de votre ménage participant à l'étude). Ce flacon est à utiliser pour la récolte de vos urines. Ce flacon doit rester stérile, aussi nous vous demandons de **ne pas le manipuler ni l'ouvrir avant le moment où vous devrez l'utiliser**.

Il vous est demandé, dans la mesure du possible, d'éviter de pratiquer une activité physique la veille du prélèvement (c'est-à-dire aujourd'hui, à moins qu'un RDV ultérieur n'ait été pris).

La procédure à suivre pour le prélèvement est la suivante :

1. Aujourd'hui, évitez de faire trop d'efforts physiques si vous le pouvez (marche et course à pied, vélo, portage de paquets, jardinage, etc.) ;
2. Demain matin au réveil, urinez comme d'habitude en prenant soin de bien vider votre vessie au maximum : **ne récoltez pas ces urines** ;
3. **Si vous avez de nouveau besoin d'uriner avant que l'équipe d'enquête n'arrive (secondes urines du matin)**, suivez la procédure suivante :
  - a. Afin d'éviter les contaminations bactériennes, lavez-vous préalablement les mains avec du savon ;
  - b. Ouvrez le flacon en évitant de toucher l'intérieur ;
  - c. Pour la femme : vous écarter les lèvres ;
  - d. Vous commencez à uriner en dehors du pot, puis sans cesser d'uriner, vous placez le pot sous le jet d'urines pour le remplir presque jusqu'à ras-bord, mais sans le faire déborder, et l'écartez du jet lorsqu'il est plein ;
  - e. Lorsque vous avez fini d'uriner, vous refermez le flacon en vous assurant que vous avez bien vissé le couvercle ;
  - f. Vous vous relavez les mains au savon et essuyez l'extérieur du flacon ;
  - g. Cet échantillon d'urines est fragile et nous vous demandons :
    - i. de noter l'heure à laquelle vous l'avez pris ;
    - ii. de le déposer dans un endroit frais et à l'abri de la lumière jusqu'à l'arrivée de l'enquêteur.
4. **Si vous n'avez pas eu de nouveau besoin d'uriner avant que l'équipe d'enquête n'arrive**, attendez les instructions des enquêteurs qui vous re-expliqueront comment réaliser le recueil à leur arrivée.

**Attention** : Si vous avez oublié de recueillir les secondes urines, n'hésitez pas à le dire à l'enquêteur et à lui indiquer à quel moment l'échantillon que vous lui donnez a effectivement été pris, **ou attendez sa venue** pour le réaliser en sa présence.  
**LE PLUS IMPORTANT POUR NOUS EST D'AVOIR UNE INFORMATION FIABLE SUR LES URINES QUE VOUS NOUS FOURNISSEZ.**

## Urines : récolte, analyses sur place, fiche de prélèvement

Le pot d'urine est récolté chez le participant dans la matinée. On vérifie d'abord auprès du participant la correspondance entre le contenu du pot (prénom) et l'identité du participant. Une **étiquette OTARI** (U pour urines + identifiant OTARI du participant) **est alors immédiatement accolée sur le pot** (de manière à recouvrir le prénom).

### Bandelettes urinaires

Un certain nombre d'exams doivent être effectués au plus vite sur les urines non centrifugées, donc **sur place** chez le participant, ce à l'aide d'une bandelette urinaire :

1. densité urinaire
2. pH
3. protéinurie
4. glucosurie
5. hématurie
6. leucocyturie

#### Procédure

1. Après s'être assuré que le flacon est bien fermé, le retourner doucement de haut en bas pour assurer son homogénéisation ;
2. Retirer une bandelette du flacon sans toucher les zones réactives avec les doigts ;
3. Refermer immédiatement le flacon ;
4. Immerger brièvement la bandelette (une seconde au maximum) de manière à ce que toutes les zones réactives soient au contact de l'urine ;

Trempage (1 s.)

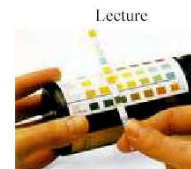


5. Égoutter la bandelette en passant le bord contre le rebord du récipient puis tapoter brièvement (une seconde) le bord sur une surface absorbante ;

Égouttage



6. Maintenir la bandelette en position horizontale pour empêcher toute interférence entre les plages réactives et/ou la contamination de l'urine par les doigts ; attendre **60s** avant d'effectuer la lecture des plages : *densité urinaire, pH, protéines, glucose, sang et hémoglobine*, et **120s** avant la lecture de la plage *leucocytes* ;
7. Lire les résultats visuellement par rapprochement avec l'échelle colorimétrique ;



8. Consigner les résultats sur la « **Fiche de prélèvement et de suivi des urines** » (questions **1 à 5**) sur laquelle est collée une étiquette OTARI.

### Dépôt sur glace

**Note importante** : les échantillons doivent rester le moins longtemps possible à température ambiante (moins de deux heures après leur prélèvement pour l'analyse par bandelettes urinaires). Aussi, une fois **les analyses (bandelettes) réalisées, déposer immédiatement le pot sur glace**.

Prendre soin de bien renseigner :

1. **L'heure du prélèvement** indiquée par le participant (question 1) ;
2. **L'heure du recueil** par l'enquêteur (analyse par bandelette et dépôt sur glace, questions 3 et 5).

## Choix et prélèvement des items alimentaires

### Identification et choix des items à prélever

Nous souhaitons prélever deux échantillons alimentaires au sein de chaque ménage enquêté. Les aliments doivent être choisis selon trois critères d'importance décroissante :

- Critère 1 : être des vecteurs connus d'OTA ;
- Critère 2 : être consommés fréquemment par au moins deux des membres du ménage ;
- Critère 3 : être stockés au sein du ménage avant préparation et consommation.

Critère 1 : nature de l'aliment

Parmi les deux aliments choisis, l'un doit être à base de céréales et l'autre appartenir à un autre groupe d'aliments cf. tableau (non exhaustif) :

Céréales et produits céréaliers	Autres
Blé	Café
Orge	Thé
Bsissa (poudre et préparée, à l'huile)	Vin
Riz	Bière
Farine	Épices
Pâtes alimentaires	Fruits secs (dattes, raisins, etc.)
Semoule	Légumes secs (légumineuses)
Sorgho	

Critère 2 : fréquence de consommation

Les deux aliments choisis doivent présenter une fréquence de consommation importante chez au moins deux des membres du ménage participant à l'étude d'après les réponses apportées au questionnaire de fréquence des consommations alimentaires.

Seules les matières premières ou produits transformés sont prélevés, pas les plats composés. L'enquêteur doit donc faire un effort de correspondance entre plats composés et ingrédients alimentaires. Il peut pour cela s'aider de la feuille de recettes jointe.

Critère 3 : habitudes de stockage

L'aliment céréalier choisi doit **de préférence** être couramment stocké par le ménage avant sa consommation. Si l'autre aliment identifié comme souvent consommé est de type fruits secs ou légumes secs, on prélèvera de même préférentiellement ceux qui sont couramment stockés par le ménage et non pas achetés au fur et à mesure des besoins de consommation. Ces informations sont déduites du questionnaire d'habitudes de stockage (questions D1 & D2). Le critère de fréquence de consommation (2) est toutefois plus important que ce dernier (3). Aussi un aliment ne devrait-il pas être prélevé pour la seule raison de son stockage ménager.

### Modalité des prélèvements

Pour rendre le prélèvement plus acceptable et courtois, il est demandé à la personne du ménage en charge des repas de réaliser **elle-même** les deux prélèvements de 50 à 100g à l'aide des cuillères jetables et des sacs à congélation fournis et **pré-étiquetés avec le code OTARI du ménage**.

Des explications claires lui sont toutefois fournies quant à **l'importance de ne pas choisir** une partie de son stock pour des raisons qui seraient liées à ses croyances par rapport au caractère sain de l'échantillon fourni.

**Le participant ne doit pas être tenté de fournir des échantillons de particulièrement mauvaise qualité (moisissure visible ou durée de stockage exceptionnellement longue) ni de qualité supérieure à la moyenne de la consommation du ménage (approvisionnement le plus récent, meilleures conditions de conservation), mais un échantillon « courant ».**

Le contenu de chaque sac est alors immédiatement identifié par une **étiquette portant le nom de l'aliment prélevé**, en plus de l'étiquette d'identification du ménage préalablement apposée.

## Liste des aliments composés tunisiens comprenant des ingrédients vecteurs d'OTA

Aliments	Ingrédients et proportions
Bsissa	Blé (50%) + pois-chiches (50%) + eau + aromates ± huile Orge + eau Sorgho + eau
Chamia	Pâte à base de graines de sésame + fruits secs (ex : amandes 1%)
Mbassess	Semoule de blé + huile
Tajine	Pain berbère à base de farine de blé
Mlawi	Idem + huile
Tabouna	Pain berbère cuit au four arabe (tabouna)
Tchiche	Soupe de semoule d'orge
Assida huile	Pâte à base de farine de blé + huile ± dattes ± miel (aux pignons pour le Mouled, l'anniversaire du Prophète)
Bazine	Assida du Sud non sucrée avec sauce piquante
Borghol osbène	Blé concassé avec osbène (abats de mouton, riz, pois chiches, viande, légumes)
Brick thon-œuf	Farine de blé de la feuille (15%) + thon + œuf
Chakchouka	Légumes de saison (Pomme de terre, citrouille) + oignons ± légumes secs (20% de fèves, pois chiches)
Chorba	Petites pâtes de blé cuites en soupe (10% pâtes) + eau
Chorba orge	Cf. Tchiche
Couscous viande ou poisson	Semoule de blé (90%) + légumes secs (5%)
Couscous légumes	Semoule de blé (90%) + légumes secs (5%)
Harguema	
Hlalem	Pâte à base de farine de blé et eau, pétrie et coupée en petits morceaux pour faire une soupe ± 2% légumes secs
Hlalem kadid	Hlalem + viande séchée
Lablabi	Pois chiches (50%) + pain (50%) ± œufs
Macaronis ± viande	Pâtes (blé dur)
Mermez	Sauce tomate + oignons + pois chiches (~ 5%)
Mhamess	Cf. Hlalem mais la pâte est passée au tamis et forme des boulettes (comme des gros grains de couscous)
Mloukia	Sauce verte + viande + huile
Sohloub	Farine de sorgho (90%) + eau ou lait

## RESUME

La réalité et l'importance des effets sanitaires de l'exposition alimentaire à l'ochratoxine A (OTA), une mycotoxine néphrotoxique et cancérogène chez l'animal, posent encore aujourd'hui largement question.

Nous développons trois approches épidémiologiques dans l'évaluation du risque lié à l'OTA : (1) description de l'incidence des insuffisances rénales terminales traitées en Tunisie (1992-2001) ; (2) modélisation de l'exposition de la population française avec étude de sensibilité (données sources et modèle) ; (3) mise en place d'une étude épidémiologique transversale et multicentrique en population tunisienne (protocole OTARI : OTA, Tunisie, Alimentation, Rein, Investigation).

Nos résultats méthodologiques et opérationnels suggèrent que l'exposition à l'OTA est faible dans la population française et ne constituerait un facteur de risque potentiel pour certaines néphropathies en population tunisienne qu'en cas de cumul de conditions défavorables au maintien de l'intégrité rénale.

## MOTS-CLES

Risque alimentaire, épidémiologie, mycotoxines, insuffisance rénale, exposition alimentaire, biomarqueurs.

## ABSTRACT

The true nature and importance of health effects related to dietary exposure to ochratoxin A (OTA), a ubiquitous food mycotoxin proved to be nephrotoxic and carcinogenic in animals, is still unknown. We develop three different approaches to an epidemiological risk assessment of OTA. (1) First, we describe recent trends of incidence of treated end-stage renal disease (ESRD) in the Tunisian population (1992-2001). (2) Then, we model the exposure of the French population and perform a sensitivity analysis (input data and model structure). (3) Last, we design a cross-sectional and multicentric field study in the Tunisian population (OTARI project).

Our results show that the exposure of the French population is low. Moreover, it seems that OTA exposure could not be considered as a potential risk factor for chronic kidney disease within the Tunisian population unless people accumulate several conditions favourable to kidney impairment.

## KEY-WORDS

Food chemical, risk assessment, epidemiology, mycotoxins, chronic kidney disease, dietary exposure, biomarkers.