

Rôle de l'aflatoxine dans l'aflatoxicose et le cancer du foie

Alors que l'intérêt s'est porté essentiellement sur le rôle de l'exposition aux aflatoxines dans le carcinome hépatocellulaire, au cours des années, plusieurs cas d'aflatoxicose ont été rapportés dans plusieurs régions situées dans des pays en développement (Shank et coll., 1971).

Empoisonnement aigu à l'aflatoxine

L'aflatoxicose se manifeste par des vomissements, des douleurs abdominales, un œdème pulmonaire, des infiltrations graisseuses et la nécrose du foie. Dans les années 1970, il s'est produit dans l'ouest de l'Inde une épidémie de ce que l'on pense être un empoisonnement à l'aflatoxine, suite à la consommation de maïs fortement moisie. Cette épidémie a entraîné au moins

97 décès, tous survenus dans des foyers où l'on avait consommé du maïs contaminé. L'histopathologie pratiquée sur des prélèvements de foie ont révélé une prolifération intense du canal cholédoque, lésion souvent observée chez les animaux de laboratoire après une exposition aiguë à l'aflatoxine (Krishnamachari et coll., 1975 ; Bhat et Krishnamachari, 1977). Une épidémie d'aflatoxicose aiguë survenue au Kenya en 1981 a également été associée à la consommation de maïs hautement contaminé (Ngindu et coll., 1982). On a compté une vingtaine d'hospitalisations, avec une mortalité de 60%. Dans un rapport plus récent (Lye et coll., 1995), la consommation de nouilles contaminées par des aflatoxines a entraîné une encéphalopathie hépatique aiguë chez des enfants en Malaisie. On a soupçonné la présence

de près de 3 mg d'aflatoxine par portion individuelle de nouilles contaminées.

En avril 2004, l'une des plus importantes épidémies d'aflatoxicose qui aient été rapportées s'est produite dans une zone rurale du Kenya, avec 317 cas et 125 décès. L'épidémie était due essentiellement à la contamination par l'aflatoxine du maïs produit localement. Lors d'une enquête portant sur 65 marchés et 243 vendeurs de maïs, 350 échantillons de maïs ont été recueillis dans les districts les plus touchés. De ces échantillons de maïs, 55% avaient des taux d'aflatoxine supérieurs au seuil réglementaire de 20 ppb établi par le Kenya, 35% avaient des taux supérieurs à 100 ppb et 7% des niveaux supérieurs à 1000 ppb. A Makueni, district qui avait enregistré le plus grand nombre de cas d'aflatoxicose, la teneur

en aflatoxine du maïs vendu sur les marchés étaient significativement plus élevée qu'à Thika, district avec le moins de cas (moyenne géométrique d'aflatoxine, 52,91 ppb contre 7,52 ppb ; $P = 0,0004$). La probabilité de taux d'aflatoxine supérieurs à 20 ppb était plus grande pour le maïs provenant des fermes locales situées dans les zones affectées, que pour le maïs acheté dans d'autres régions du Kenya ou dans d'autres pays (rapport des cotes ou odds ratio [OR] : 2,71 ; intervalle de confiance [IC] à 95% : 1,12–6,59). Outre l'enquête sur l'exposition à l'aflatoxine effectuée sur les marchés, cette épidémie de 2004 a permis d'établir pour la première fois que les niveaux d'adduits aflatoxine-albumine (AF-alb) permettaient de confirmer indépendamment l'exposition des individus (CDC, 2004 ; Azziz-Baumgartner et coll., 2005 ; Lewis et coll., 2005 ; Strosnider et coll., 2006 ; Probst et coll., 2007).

Carcinome hépatocellulaire

Depuis des décennies, on sait que l'exposition à l'aflatoxine est responsable de cancers du foie chez l'homme ainsi que dans plusieurs espèces animales. Le Centre international de Recherche sur le Cancer (CIRC) a évalué à plusieurs reprises le risque de cancérogénicité des aflatoxines, en commençant en 1972 avec le Volume 1 des Monographies du CIRC sur l'Évaluation des Risques de Cancérogénicité pour l'Homme (IARC, 1993). Depuis, de nombreuses études chez l'homme et chez l'animal de laboratoire ont apporté des informations complémentaires, et les mélanges d'aflatoxines d'origine naturelle sont maintenant classés dans le Groupe 1, où figurent les agents cancérogènes pour l'homme (IARC, 1993). Par ailleurs, comme décrit plus loin, l'exposition

simultanée à l'aflatoxine et au virus de l'hépatite B (VHB) est courante dans les pays en développement, ce qui augmente énormément le risque de développer un carcinome hépatocellulaire (CHC) (Wu et coll., 2013). Les individus exposés aux deux agents cancérogènes ont un risque accru de développer un CHC par rapport à ceux qui sont exposés uniquement à l'aflatoxine (Wogan et coll., 2012).

Le CHC représente 5,6% de l'ensemble des cancers ; c'est le sixième cancer le plus fréquent dans le monde (Ferlay et coll., 2013). L'incidence mondiale du cancer du foie, cancer pratiquement toujours fatal, varie énormément, et elle est beaucoup plus élevée dans les pays moins développés d'Asie et d'Afrique sub-saharienne. Globalement, on compte chaque année plus de 780 000 nouveaux cas de cancers du foie, et plus de 745 000 décès (Ferlay et coll., 2013). Contrairement à la plupart des cancers fréquents dans les pays développés où plus de 90% des cas sont diagnostiqués chez des individus âgés de 45 ans et plus, le cancer du foie commence à apparaître chez les hommes et les femmes dès l'âge de 20 ans dans les régions à haut risque, avec un pic dans la tranche d'âge 40–49 ans chez les hommes et 50–59 ans chez les femmes (Parkin et coll., 2005 ; Chen et coll., 2006). Cette différence d'âge au moment de l'apparition du CHC peut s'expliquer par l'importance de l'exposition et sa persistance au cours de la vie. Des différences entre hommes et femmes ont également été décrites au niveau de l'incidence du cancer du foie, le taux d'incidence annuel mondial standardisé sur l'âge étant de 15,3 pour 100 000 chez les hommes et de 5,4 pour 100 000 chez les femmes (Ferlay et coll., 2013). Ces résultats épidémiologiques correspondent également aux données

obtenues chez l'animal de laboratoire avec l'aflatoxine : l'apparition du cancer est plus précoce chez les rats mâles que chez les femelles (Wogan et Newberne, 1967).

Pendant plus de 50 ans l'étude de la relation entre l'exposition à l'aflatoxine et le cancer du foie chez l'homme a fait appel à des études écologiques, des enquêtes transversales, des études cas-témoins et des études prospectives de cohortes dans les populations exposées. Les premières études, réalisées aux Philippines, ont démontré qu'il était possible de détecter dans l'urine un métabolite résultant de l'oxydation de l'aflatoxine, qui pouvait servir de marqueur de la dose ingérée (Campbell et coll., 1970). Dans des études ultérieures réalisées au Kenya, Autrup et coll. (1983, 1987) ont rapporté la présence d'adduits de l'aflatoxine B₁ (AFB₁) à l'ADN (adduits AFB₁-ADN) dans des échantillons d'urine humaine. Des travaux ultérieurs effectués en Chine et en Gambie (Afrique occidentale), régions où l'incidence du CHC est élevée, ont consisté à examiner à la fois l'ingestion alimentaire d'aflatoxine et les taux de biomarqueurs urinaires de l'aflatoxine (Groopman et coll., 1992). Des études utilisant comme marqueurs les taux urinaires d'adduits AFB₁-ADN et d'aflatoxine M₁ (AFM₁) ont montré une relation dose-dépendante entre l'ingestion et l'excrétion d'aflatoxine. Gan et coll. (1988) et Wild et coll. (1992) ont suivi les variations des taux d'AF-alb sériques et observé une association hautement significative entre l'ingestion d'aflatoxine et les taux d'adduits.

Beaucoup d'études cas-témoins publiées ont exploré la relation entre l'exposition à l'aflatoxine et le CHC. Dans l'une des premières études cas-témoins menée aux Philippines, Bulatao-Jayme et coll. (1982) ont comparé l'ingestion d'aflatoxine

chez les sujets atteints de cancer du foie avec celle de témoins appariés pour l'âge et le sexe. Ils ont trouvé que l'exposition moyenne quotidienne à l'aflatoxine chez les sujets atteints de CHC était 4,5 fois supérieure à celle des témoins ; la consommation d'alcool pourrait toutefois avoir amplifié cet effet. Van Rensburg et coll. (1985) et Peers et coll. (1976) ont effectué le même type d'études au Mozambique et au Swaziland. A nouveau, l'apport quotidien moyen d'aflatoxine dans l'alimentation était positivement corrélé à l'incidence du CHC, et les données suggèrent également une relation dose-dépendante entre le cancer du foie et l'ingestion d'aflatoxine.

Dans la Région autonome Zhuang du Guanxi, en Chine, Yeh et Shen (1986) et Yeh et coll. (1989) ont examiné l'interaction entre l'infection par le VHB et l'exposition à l'aflatoxine, en distinguant deux groupes selon les niveaux (faible ou élevé) de contamination. Chez les individus dont le sérum montrait la présence de l'antigène de surface du VHB (antigène HBs) et qui étaient exposés à des taux élevés d'aflatoxine, l'incidence du CHC était 10 fois plus élevée que chez ceux qui vivaient dans des zones où la contamination par l'aflatoxine était faible. Les sujets négatifs pour l'antigène HBs et qui consommaient des aliments hautement contaminés par l'aflatoxine avaient un taux de CHC comparable à celui des sujets positifs pour l'antigène HBs dont l'alimentation était faiblement contaminée par l'aflatoxine (Yeh et coll., 1989). Dans une étude cas-témoins menée à Taïwan, les adduits AF-alb et AF-ADN ont été mesurés dans des prélèvements de tissu hépatique (Lunn et coll., 1997). La proportion de sujets avec un niveau d'adduits AF-alb détectable était plus élevée chez ceux qui étaient

atteints de CHC que chez les témoins appariés (OR : 1,5). Une association statistiquement significative a été trouvée également entre la détection d'AF-alb et le risque de cancer primitif du foie chez les hommes de moins de 52 ans (OR ajusté sur plusieurs variables : 5,3).

Dans une autre étude menée à Qidong, en Chine, 145 hommes souffrant d'une infection chronique par le VHB ont été suivis pendant 10 ans pour déterminer si l'exposition à l'aflatoxine, ou l'exposition concomitante au virus de l'hépatite C (VHC), ou le fait d'avoir des antécédents familiaux de CHC était lié à une augmentation du risque de développer un CHC. Les huit échantillons d'urine recueillis mensuellement avant le début de la phase de suivi auprès chaque patient ont été mélangés et analysés pour rechercher la présence d'AFM₁. L'AFM₁ a été décelée chez 78 (54%) des sujets, et le risque de CHC était multiplié par 3,3 (IC 95% : 1,2-8,7) chez ceux qui présentaient des taux d'AFM₁ détectables (> 3,6 ng/l). Le risque attribuable à l'exposition à l'aflatoxine, défini par la présence d'AFM₁ détectable, était de 0,553 (IC 95% : 0,087-0,94). Le risque relatif de cirrhose fatale pour les individus dont l'urine contenait des taux élevés d'AFM₁ était de 2,8 (IC 95% : 0,6-14,3). L'infection concomitante avec le VHC multipliait le risque de CHC par 5,8 (IC 95% : 2,0-17), après ajustement sur l'âge et la présence (ou l'absence) d'AFM₁. Cette étude montre que l'exposition à l'aflatoxine, identifiée par la présence d'AFM₁ dans l'urine, peut rendre compte d'une part importante du risque de CHC chez les hommes présentant une hépatite B chronique (Sun et coll., 1999).

Deux grandes études de cohortes intégrant les biomarqueurs de l'aflatoxine ont clairement démontré le rôle étiologique de cet

agent cancérigène dans le CHC. La première étude, qui portait sur 18 000 hommes vivant à Shanghai, en Chine, a recherché si les biomarqueurs du VHB et les biomarqueurs de l'aflatoxine étaient des marqueurs indépendants et interactifs du risque de CHC. L'étude cas-témoins nichée dans cette cohorte a révélé un risque relatif de CHC de 3,4 (augmentation statistiquement significative) pour les sujets présentant le biomarqueur urinaire de l'aflatoxine (AFB₁-N7-guanine). Pour les hommes dont le sérum était positif pour l'antigène HBs mais dont l'urine n'indiquait pas d'exposition à l'aflatoxine, le risque relatif était de 7,3, mais chez les sujets qui possédaient à la fois le biomarqueur urinaire de l'aflatoxine et l'antigène HBs, le risque relatif était 59,4 (Ross et coll., 1992 ; Qian et coll., 1994). Ces résultats militent en faveur de l'existence d'une relation causale entre la présence des biomarqueurs spécifiques de l'agent cancérigène et du virus et le risque de CHC. Une deuxième grande étude de cohorte menée par la suite à Taïwan a confirmé en substance les résultats de l'étude de Shanghai. Wang et coll. (1996) ont effectué une étude de cas de CHC et de témoins nichée au sein de la cohorte taïwanaise et trouvé, chez les sujets infectés par le VHB, un odds ratio ajusté de 2,8 pour la présence d'AF-alb détectable par rapport à l'absence d'AF-alb détectable, et un odds ratio ajusté de 5,5 pour des taux élevés d'aflatoxine urinaire par rapport à des taux faibles. La même cohorte a donné lieu à une seconde étude cas-témoins nichée, qui a montré une relation dose-réponse entre les taux d'AFM₁ urinaires et le risque de CHC chez les porteurs chroniques du VHB (Yu et coll., 1997). De même que dans la cohorte de Shanghai, le risque de

CHC associé à l'exposition à l'AFB₁, était beaucoup plus important chez les porteurs du VHB qui avaient des taux détectables d'AFB₁-N7-guanine dans l'urine.

La relation entre l'exposition à l'aflatoxine et le développement du CHC a également été mise en évidence dans les études de biologie moléculaire portant sur le gène *p53* suppresseur de tumeur, gène très fréquemment muté dans de nombreux cancers humains (Greenblatt et coll., 1994). De nombreuses études sur les mutations de *p53* dans les CHC survenant dans les populations exposées par leur alimentation à des niveaux élevés d'aflatoxine ont identifié la présence, à des fréquences élevées, de transversions G:C → T:A, essentiellement au niveau du codon 249 (Bressac et coll., 1991 ; Hsu et coll., 1991). En revanche, aucune mutation du codon 249 de *p53* n'a été observée dans les CHC recensés au Japon ni dans les autres régions où l'exposition à l'aflatoxine est faible (Ozturk, 1991 ; Aguilar et coll., 1994).

Il apparaît ainsi que la transversion G → T au niveau de la troisième base du codon 249 de *p53* est associée à l'exposition à l'aflatoxine. C'est ce qu'indiquent les études comparant la prévalence des mutations du codon 249 de *p53* dans les CHC survenant dans les populations des régions où l'exposition à l'aflatoxine est élevée, et des régions où l'exposition est faible. Les données *in vitro* vont dans le sens de cette hypothèse. L'utilisation de ces mutations particulières comme biomarqueurs de détection précoce offre des perspectives intéressantes pour la prévention du CHC (Sidransky et Hollstein, 1996). Dans

une étude pionnière, Kirk et coll. (2000) ont rapporté pour la première fois la détection de mutations au niveau du codon 249 du gène *p53* dans le plasma de patients atteints de cancer du foie résidant en Gambie ; le type de mutation n'était toutefois pas déterminé. Les auteurs ont également rapporté la présence de cette mutation dans le plasma d'un petit nombre de patients cirrhotiques. Etant donné la relation étroite entre la cirrhose et le développement ultérieur du CHC, il convient d'explorer la possibilité d'utiliser cette mutation comme marqueur de détection précoce. Jackson et coll. (2001) ont examiné 25 tumeurs primitives du foie à la recherche de mutations particulières de *p53*. L'analyse de 20 paires supplémentaires de prélèvements de tumeur et de plasma a montré que 11 échantillons de tumeurs et 6 échantillons de plasma contenaient la mutation particulière. Le même groupe a cherché à savoir à quel moment il était possible de détecter cette mutation dans le plasma, en effectuant l'analyse sur des prélèvements effectués chez les mêmes patients avant et après le diagnostic clinique de CHC. Cette étude a bénéficié de la disponibilité d'échantillons de plasma collectés longitudinalement dans une cohorte de 1638 individus à haut risque suivis depuis 1992 à Qidong, en Chine. Il est apparu que 21,7% (IC 95% : 9,7–41,9%) des échantillons de plasma prélevés avant le diagnostic de cancer du foie avaient des mutations détectables au niveau du codon 249 de *p53*, alors que cette mutation était présente dans 44,6% (IC 95% : 21,6–70,2%) des échantillons de plasma prélevés après le diagnostic de cancer du foie. Ce

pourcentage d'échantillons positifs après le diagnostic de cancer du foie est du même ordre que les 50% pour l'ensemble des tumeurs du foie à Qidong, ce qui suggère une concordance de près de 90% des résultats obtenus en ce qui concerne la mutation du codon 249 de *p53* à partir du plasma et à partir de la tumeur.

Enfin, les travaux récents ont bénéficié du registre du cancer basé dans la population qui permet de retracer la mortalité par cancer primitif du foie à Qidong, ville chinoise qui compte 1,1 million d'habitants. Cette base de données indique une réduction de plus de 50% des taux de mortalité par CHC chez les habitants de Qidong de moins de 35 ans appartenant aux cohortes de naissance situées entre 1960 et 1980. La prévalence de l'infection à VHB n'avait pas changé, car tous étaient nés avant la vaccination universelle des nouveau-nés. Les biomarqueurs de l'aflatoxine ont été recherchés dans des échantillons de sérum sélectionnés au hasard dans les banques de produits biologiques prélevés entre 1980 et nos jours et correspondant à ces cohortes. Les taux médians d'AF-alb, biomarqueur de l'aflatoxine, sont passés de 19,3 pg/mg en 1989 à non détectables (< 0,5 pg/mg) en 2009. Cette réduction de 65% de la mortalité par cancer primitif du foie dans la population peut s'expliquer par la levée de l'obligation gouvernementale de consommer le maïs produit localement et le remplacement du maïs par le riz. Ces données soulignent l'importance du rôle que jouent les aflatoxines dans les régions où l'exposition est élevée, et où les populations sont à haut risque de CHC (Chen et coll., 2013).