

COMMUNICATIONS

Sur la présence des flavatoxines dans les aliments des animaux et dans les aliments d'origine animale destinés à l'homme

par J. JACQUET, P. BOUTIBONNES et A. TEHERANI

Nous avons, dans des publications récentes, dont une à cette Académie même (12) (4) (6), indiqué la méthode de chromatographie rapide et simple que nous utilisons pour la recherche et l'appréciation quantitative des flavatoxines B et G qui sont, en fait, des mélanges de B₁, B₂, B₂ a et G₁, G₂ respectivement.

I. — ALIMENTS DU BÉTAIL

En appliquant ce procédé à de nombreux produits alimentaires (600 échantillons à ce jour), nous n'avons trouvé que tout à fait exceptionnellement ces mycotoxines (5). Il n'en est plus de même avec les aliments du bétail, surtout du fait de la présence parmi leurs composants d'arachides ou de dérivés de celles-ci. Nous avons montré, précédemment, que les spores d'*Aspergillus flavus* que nous n'avons jamais rencontrées en Normandie et en Ile-de-France dans le sol, étaient, au contraire, d'une fréquence extrême dans les terres et poussières africaines (14). Il est, alors, inévitable qu'il y en ait quasi constamment (98 p. 100 des échantillons pour les *Aspergillus* dont 73 p. 100 pour *A. flavus*) sur les coques souterraines des fruits d'*Arachis hypogea* et, de là, elles ensementeront les graines de celles-ci et leurs dérivés solides. Si des conditions d'humidité suffisantes sont réalisées, soit au cours de la conservation chez le producteur, des stockages en usine, des transports, notamment dans les cales des bateaux, les conidies germeront et les moisissures apparaîtront. Certaines souches sont toxigènes, et la composition du milieu constitué par les arachides est éminemment favorable à la sécrétion de flavatoxines. Par ailleurs, enfin, Bou-

TABLEAU I

Fréquence de présence et teneur en aflatoxines B et G
dans les aliments des animaux

Nature	Nbre d'échantillons analysés	Nbre d'échantillons positifs	Teneur en flavatoxine en µg/kg		
			Taux minimal	Taux moyen	Taux maximal
Tourteaux d'arachide	25	19	10	330	4.500
Autres tourteaux (coton, tournesol, karité, coprah, lin, soja, cacao)	16	0			
Aliments composés:					
pour lapins	18	9	9	220	1.500
pour rats	20	7	5	65	650
pour souris	12	2	1	3	20
pour poulets	15	4	2	4	10
pour porcs	12	3	10	5	50
pour le gros bétail.	23	5	5	90	2.000

DERGUES et ses collaborateurs ont établi que la contamination de l'arachide était possible même avant l'arrachage (2).

Bien entendu, tout autre produit, suffisamment humide, et sur lequel un clone toxigène d'*A. flavus*, *A. parasiticus* et *A. wentii*, toutes espèces qui peuvent être actives de ce point de vue, à des titres et taux divers, se sera développé, donnera lieu à des phénomènes analogues.

Quoi qu'il en soit, le résultat de nos investigations sur les aliments du bétail, tels qu'ils sont vendus et utilisés en France, figure dans le tableau I. Il est évident que les tourteaux d'arachides, par leur fréquence et leur concentration, y tiennent une place à part. Les aliments composés du bétail prennent le second rang, surtout en raison de l'apport à leur intérieur de tourteaux d'arachides contaminés.

Nous avons réalisé quelques examens mycologiques mettant en évidence les ensemencements en spores de certains de ces aliments ; et, comme il fallait s'y attendre, tant que les conidies n'ont pas germé, elles ne jouent pas de rôle déterminant dans la présence de mycotoxines et leur teneur. Les spores ne constituent évidemment que l'ensemencement initial du produit. Pour qu'elles soient dan-

gereuses, il faudrait qu'elles proviennent, d'abord, d'un clone toxigène, puis qu'elles aient germé et que les colonies de moisissures trouvent de plus un milieu favorable. Quant à la teneur en flavatoxine qu'elles peuvent apporter, puisqu'elles en contiennent (13), elle est très faible, sinon insignifiante, et encore faut-il que la souche qui leur a donné naissance soit toxigène et ait, elle-même, poussé sur un substrat inducteur de la production de flavatoxine. A titre de curiosité, nous avons, de plus, récolté quelques colonies mycéliennes obtenues à partir de ces aliments et mesuré leur pouvoir sécréteur de mycotoxine qui s'est souvent montré nul ou faible. On ne peut faire, dans la majorité des cas, aucun rapprochement entre la teneur actuelle d'un aliment en aflatoxine et sa richesse en spores d'*Aspergillus flavus*.

On ne dispose pas de normes officielles françaises pour juger de la situation de notre pays, telle qu'elle ressort de notre enquête. On peut faire état, cependant, des recommandations de la Food and Drug Administration américaine, qui classe les nocivités dans les catégories suivantes :

Toxicité très haute : plus de 1 ppm (1) d'aflatoxine B₁.

Toxicité haute : de 0,25 à 1 ppm.

Toxicité moyenne : de 0,05 à 0,25 ppm.

Toxicité faible ou nulle : moins de 0,05 ppm.

Par ailleurs, des habitudes commerciales se sont instituées dans divers pays et calquent tout à fait les indications précédentes, si bien qu'il en ressort un certain consensus de comportement :

- Plus de 50 µg de flavatoxine par kg : arachides impropres à l'alimentation humaine,
- de 25 à 50 µg/kg : arachides refusées dans de nombreux pays,
- de 12 à 25 µg/kg : arachides admises dans la plupart des pays,
- de 5 à 12 µg/kg : arachides admises dans tous les pays,
- moins de 5 µg/kg : arachides considérées comme exemptes d'aflatoxines.

On s'aperçoit, dans ces conditions, qu'un effort sérieux est encore à faire en matière de contrôle des aliments du bétail, car des taux élevés, voire considérables, ont été constatés par nous à plusieurs reprises. Nous devons, d'ailleurs, pencher vers la sévérité, car, en dehors des effets directs maintenant bien connus, il est logique

(1) ppm = partie par million, soit 1.000 µg/kg.

de supposer aux mycotoxines des effets secondaires qui pourraient s'exercer, même en faible quantité : ralentissement de la croissance des jeunes, sortie de germes microbiens, inhibition des réactions immunitaires, actions synergiques avec d'autres causes morbides. Et puis, DRUCKREY (8 et 9) n'a-t-il pas démontré avec ses collaborateurs, ce qui a été plusieurs fois confirmé depuis, qu'en matière de cancérisation, toutes les doses, même les plus petites, comptaient ? Les effets sont irréversibles. Bien plus, il y a diminution de la dose totale nécessaire à l'induction de la malignité avec le fractionnement dans le temps sous forme de petites doses.

II. — LAIT ET PRODUITS LAITIERS

Une fois ingérées par les animaux, les aflatoxines vont se fixer partiellement dans les viandes, et s'éliminer par l'urine et le lait. Dans ce dernier, ALLCROFT et CARNAGHAN (1) ont montré qu'il s'agissait d'une forme nouvelle qu'ils ont appelée milk-aflatoxin, ou M, et donnant une tache bleue sur les chromatogrammes, de Rf inférieure à celui des métabolites B et G. Comme pour ces derniers, il s'agit, en fait, d'un mélange de M₁ et M₂. Ces corps sont respectivement des hydroxyaflatoxines de B₁ et de B₂.

Malgré son appellation, la flavatoxine M n'est pas liée au lait seul, et se trouve éliminée dans l'urine des brebis, ainsi que HOLZAPFEL, STEYN et PURCHASE (10) l'ont montré. De notre côté, nous l'avons trouvée dans les extraits de culture, à très faible taux, il est vrai, et même dans les spores d'*A. parasiticus*. En injectant à une ratte Wistar un mélange d'aflatoxines B, G et M provenant d'une culture d'*A. parasiticus*, nous avons montré que le toxique s'éliminait au niveau du rein par une petite quantité de la forme G, pas du tout de B, et une plus grosse dose de M (13).

L'appellation de milkafatoxin est donc mauvaise ; gardons seulement la lettre M. En tout cas, à partir de l'urine de rat injecté, on possède un moyen d'obtenir de la flavatoxine M, et nous avons précisé ses divers Rf dans le système des cinq solvants que nous utilisons, ce qui permettra de la repérer sur les chromatogrammes :

1. — Ether éthylique	(100)	0,08
2. — Chloroforme, méthanol . . .	(95 : 5 — V/v)	0,35
3. — Chloroforme, acétone	(90 : 10 — V/v)	0,20
4. — Méthanol, eau	(60 : 40 — V/v)	0,64
5. — Benzène, alcool, eau	(46 : 35 : 19 — V/v)	0,33-0,25

TABLEAU II

Produits	Nombre d'échantillons analysés	Nombre d'échantillons contenant des flavatoxines	Observations	
Laits individuels...	8	0	10 µg/kg	
Laits en poudre ...	30	0		
Aliments d'allaitement pour veaux...	6	1		
Yaourts	14	0		
Crèmes	8	0		
Beurres	14	0		
Margarines	12	0		
Petits suisses	5	0		
Gruyère	12	0		
Edam	3	0		présence sur la croûte de deux échantillons de colonies d' <i>A. flavus</i> non toxigène et d' <i>A. candidus</i> .
Chester	3	0		
Cantal	1	0		
Port-Salut et St-Paulin	4	0		
St Nectaire	3	3 (?)		
Tome de Savoie ...	2	0	Substance suspecte en cours d'identification plus précise.	
Fromage fondus ...	2	0		
Fromage de Savoie au marc de raisin..	1	0		
Brie	3	0		
Coulommiers	1	0		
Camembert	10	0		
Pont l'Evêque	6	0		
St-Marcellin	1	0		
Livarot	10	0		
Munster	1	0		
Maroilles	1	0		
Chèvre	3	0		
Roquefort	15	0		
Bleu d'Auvergne...	2	0		
Fourme d'Ambert..	1	0		

Par ailleurs, PURCHASE et ses collaborateurs (16), puis ROBERTS et ALLCROFT (18) ont mis au point des systèmes d'extraction spécialement adaptés à cette substance, que nous avons employés également avant de faire la chromatographie en gel de silice.

On constate, évidemment, l'inocuité des laits normands, ce qui n'est pas pour nous surprendre. Il y aurait lieu de trouver des

exploitations qui emploieraient des tourteaux fortement contaminés et voir ce qui se passerait. Il est possible que cela n'existe guère en France et que l'on y utilise surtout des aliments composés dans lesquels le toxique est forcément dilué. La situation est sûrement différente de celle de l'Afrique du Sud, où les vaches mangent des fanes d'arachides et éliminent un lait à taux élevé d'aflatoxine (17).

Le lait et les produits laitiers, par ailleurs, sont tous d'excellents milieux de culture pour *A. flavus* et ses analogues. Nous avons déjà signalé l'importance du lait à ce propos (3) ; sur 5 ml de crème placée en tubes roulants à 30 °C, nous avons obtenu au bout de 9 jours d'incubation de la même espèce 2.600 µg de flavatoxine B ; enfin, LIE et MARTH (15) ont montré qu'*A. flavus* ensemencé sur le fromage de cheddar y poussait bien et y donnait de la toxine. Une autre origine est donc possible, qui est indépendante de la précédente, où l'aliment des animaux était à incriminer, c'est l'installation, surtout sur les fromages à pâte ferme de longue conservation et où le taux d'humidité est favorable, de moisissures toxigènes, productrices des formes B et G surtout. L'étude des métabolites des champignons présente, cependant, de grandes difficultés, car il apparaît par fermentation d'autres substances fluorescentes qui se placent sur certains chromatogrammes au niveau de telle ou telle aflatoxine et que l'on peut séparer par le système différentiel (6) qui rend là, de très grands services. (C'est le cas des Livarot qui présentent tous une tache bleue spéciale qui n'a rien à voir avec les flavatoxines). Avec les Tomes de Savoie, l'alcool a du être utilisé comme solvant supplémentaire pour obtenir une migration différente. Avec le St-Nectaire, dont la mycoflore de surface est extrêmement complexe, nous n'y sommes point parvenus. Mais, nous n'avons analysé qu'un nombre trop faible d'échantillons, et nous avons besoin d'épreuves biologiques supplémentaires avant de pouvoir conclure d'une façon certaine. Le tableau II renferme nos explorations qui ne sont qu'un début en cette matière.

Il faut dire, cependant, que les produits laitiers, et notamment les fromages, constituent le milieu d'élection des *Penicillium*, alors que les *Aspergillus* y sont d'une rareté extrême, ce qui ne veut pas dire qu'il soit impossible d'y rencontrer ces derniers. Mais, la situation d'ensemble est extrêmement favorable.

III. — VIANDES ET PRODUITS CARNÉS

Nous n'avons qu'une expérience sommaire dans le rayon des viandes et de leurs dérivés, se limitant, en fait, à l'étude de quelques

moisissures apparues sur des produits carnés, alors que les échantillons examinés étaient, dans tous les cas, totalement exempts de flavatoxines. Il s'agissait des espèces citées ci-dessous. A vrai dire, elles y étaient souvent en petit nombre par rapport aux *Penicillium*, *Mucor* et *Rhizopus* qui envahissaient les surfaces. Font exception les jambons, où la résistance osmotique d'espèces comme *A. glaucus* et *terreus* leur permet de s'installer et d'y rester à peu près seules.

Jambons : *A. glaucus* (6), *A. restrictus*.

Pâtés, saucisses, andouilles, saucissons : *A. sydowi*, *A. niger*, *A. terreus* (2), *A. flavus* non toxigène.

La question est, cependant, loin d'être épuisée, puisqu'il y a parfois des moisissures qui se développent sur les viandes congelées dans les frigorifiques ; mais, il est certain que la température empêchera la toxigenèse (3) des souches productrices de mycotoxines, s'il s'en trouve. On rencontre, aussi, de temps en temps, des champignons sur les jambons et, beaucoup plus fréquemment sur les rillettes, surtout de fabrication artisanale, sur les produits préparés comme les rôtis de dindonneaux, enfin les saucissons. Or, BULLERMAN et AYRES (7) ont trouvé aux Etats-Unis des *A. flavus* toxigènes sur un salami, tandis que STRZELEKI et ses collaborateurs (19) isolaient divers *Aspergillus*, dont 4 *flavus* toxigènes d'un jambon de campagne moisi. Un inventaire doit donc être fait, bien qu'il soit sûr que les *Penicillium* domineront souvent (1). Nous aimerions, pour notre part, recevoir le maximum de prélèvements bien choisis.

IV. — CONCLUSIONS

En conclusion, il est nécessaire d'insister sur la nécessité d'un contrôle plus sévère, tant pour les industriels et commerçants, que pour les services administratifs, des aliments du bétail, en matière de flavatoxines, et surtout des arachides et de leurs dérivés. Les docteurs-vétérinaires doivent trouver là un rôle de premier plan, à la fois comme pathologistes et comme conseillers naturels des éleveurs.

La situation en matière de lait et de produits laitiers apparaît

(1) Cependant, quelques espèces de *Penicillium*, et tout particulièrement *P. puberulum*, selon HODGES et coll., synthétisent des aflatoxines identiques à celles des *Aspergillus flavus*. (B₁, B₂, G₁ et G₂) HODGES (F.), ZUST (J.), SMITH (H.), NELSON (A.), AEMBRECHT (B.) et CAMPBELL (A.), *Science*, 1964, 145, 1439-1441.

extrêmement rassurante ; et, même avec les fromages qui doivent être présentés moisissus aux acheteurs, on ne saurait avoir de crainte à cet égard. Cependant, les études doivent être poursuivies sur un très grand nombre d'échantillons de chaque type.

Pour la viande et les produits carnés moisissus, bien que le premier abord soit très favorable, le nombre de prélèvements examinés est encore trop bas pour pouvoir formuler un avis définitif. Il serait souhaitable que nos confrères puissent contribuer à cette enquête.

(Laboratoire de Microbiologie
de la Faculté des Sciences de Caen.)

BIBLIOGRAPHIE

1. ALLCROFT (A.) et CARNAGHAN (R.). — *Aspergillus flavus* toxin (Aflatoxin) in animal products. *Vet. Rec.*, 1962, **31**, 863-864.
2. BOUDERGUES (R.), CALVET (H.), DISCACCIATI (E.) et CLICHE (M.). — Note sur la présence d'aflatoxine dans les fanes d'arachides. *Rev. Elev. Vét. Pays trop.*, 1966, **19**, 567-571.
3. BOUTIBONNES (P.) et JACQUET (J.). — Recherches sur la production de toxine par *Aspergillus flavus*. *Bull. Acad. Vét.*, 1967, **40**, 393-403.
4. — Sur la recherche des produits de sécrétion des microbes. Application aux *Aspergillus*. *C. R. Soc. Biol.*, 1969, **163**, 118-123.
5. — Sur la fréquence de l'aflatoxine et des *Aspergillus* dans les aliments. *C. R. Soc. Biol.*, 1969, **163**, 1119-1124.
6. — Chromatographie rapide en couche mince des flavatoxines contenues dans les aliments. *Bull. Acad. Vét.*, 1969, **42**, 825-833.
7. BULLERMAN (L.) et AYRES (C.). — Aflatoxin producing potential of fungi isolated from cured and aged meats. *Appl. Microb.*, 1968, **16**, 1945-1946.
8. DRUCKREY (H.). — *Klin. Wschr.*, 1943, **22**, 532.
9. DRUCKREY (H.) et KUPFMULLER (K.). — *Zschr. Natur. forsch.*, 1948, **3b**, 254.
10. HOLZAPFEL (C.), STEYN (P.) et PURCHASE (I.). — Isolation and structure of aflatoxin M₁ and M₂. *Tetrahedron Lett.*, 1966, **25**, 2799-2804.
11. JACQUET (J.) et BOUTIBONNES (P.). — Recherches sur les mycotoxines, spécialement la flavatoxine. Intérêt pour la microbiologie alimentaire. *Bull. Acad. Nat. Méd.*, 1967, **151**, 561-565.
12. — Procédé de détection rapide des flavatoxines par chromatographie en couche mince. Application à la microbiologie alimentaire. *C. R. Acad. Agric.*, 1967, **53**, 1244-1251.
13. — Fluorescence des aflatoxines et des *Aspergillus*. *C. R. Soc. Biol.*, 1969, **163** (en cours de publication).
14. — Sur la fréquence de répartition des spores d'*Aspergillus*. Conséquences hygiéniques. *Bull. Acad. Nat. Méd.*, 1969, **153** (en cours de parution).
15. LIE (J.) et MARTH (E.). — Formation of aflatoxin in cheddar cheese by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *J. Dairy Sc.*, 1967, **10**, 1708-1710.

16. PURCHASE (I.) et STEYN (M.). — Estimation of aflatoxin M. *J. of the A. O. A. C.*, 1967, **50**, 363-366.
 17. PURCHASE (I.) et VORSTER (L.). — Aflatoxin in commercial milk samples. *South Afr. Med. J.*, 1968, **42**, 219-224.
 18. ROBERTS (B.) et ALLCROFT (R.). — A note on a semi-quantitative estimation of aflatoxin M. in liquid milk by thin layer chromatography. *Food cosmet. Toxicol.*, 1968, **6**, 339-340.
 19. STRZELEKI (E.), LILLARD (H.) et AYRES (J.). — Country cured ham as a possible source of aflatoxin. *Appl. Microb.*, 1969, **18**, 938-939.
-