

Nouvelles recherches sur les effets des flavacoumarines (aflatoxines) sur les animaux

par J. JACQUET et P. BOUTIBONNES

Quand on consulte les travaux antérieurs, portant sur les animaux, aussi bien les arthropodes, que les poissons, oiseaux ou mammifères, on en retire l'impression d'une quasi-universalité d'action des flavacoumarines. Et cependant, nous avons montré que, parmi les petits crustacés d'eau douce, seuls les daphnies étaient très sensibles, au point de constituer un excellent réactif biologique (6). Par ailleurs, sur les végétaux, nous avons montré que seules certaines graines subissaient une inhibition de germination, alors que les autres échappaient à cette action (7). Aussi, nous a-t-il paru intéressant de poursuivre notre exploration, d'abord, pour relever les résistances relatives qui ne manqueront pas d'apparaître, ensuite, pour trouver, peut-être, matière à mise au point de procédés de diagnose biologique, plus rapides, sensibles et spécifiques que l'essai sur caneton d'un jour.

Nous avons constamment utilisé dans nos recherches un mélange de 40 p. 100 de la forme B et 60 p. 100 de la forme G, du mycotoxique obtenu par culture d'*Aspergillus parasiticus*.

1. — ARTHROPODES

BROWN et coll. (3) (4) ont montré que la crevette d'eau saumâtre *Artemia salina*, était sensible pour 60 p. 100 des sujets, à 37,5 °C et en 24 h, à une teneur de 0,5 µg/ml et à 90 p. 100 à 1 µg/ml. Or, il est très facile de se procurer dans le commerce des œufs de cet animal et d'en obtenir des larves ; 2 ml d'eau salée à 1 p. 100, avec ou sans flavacoumarine ont été mis dans des salières de verre où 20 à 30 œufs avaient été disposés. Les taux d'éclosion observés au bout de 48 h à la température du laboratoire n'ont pas été influencés par des teneurs de toxique allant de 0,01 à 5 µg par ml. La survie des larves ne nous a pas paru, non plus, sensiblement modifiée par des concentrations s'étalant de 0,05 à 5 µg/ml.

Bull. Acad. Vét. — Tome XLIV (Janvier 1971). — Vigot Frères, Éditeurs.

Continuant notre emploi de *Daphnia pullex* L., nous avons précisé l'action comparative de quelques substances supplémentaires (tableau I) à ajouter au tableau que nous avons précédemment publié.

TABLEAU I

Produit	Nombre d'animaux mis en expérience	Concentration minimale nécessaire en $\mu\text{g/ml}$ pour obtenir une mortalité de l'ordre de 100 p. 100	Temps d'action en heures	Observations
Formol	70	40	3	20 p. 100 de morts sont obtenus avec 1 μg par ml en 24 heures.
Nitrite de potassium	70	1.000	3	
Acide formique	70	10	12	
Acide oxalique	70	1.000	quelques minutes	

Quant à la classe des insectes qui a été très peu utilisée, elle est représentée dans nos essais par les larves dites ver de farine du coléoptère *Tenebrio molitor*.

Du son de blé est réduit en poudre très fine au broyeur Waring blender, puis tamisé sur 2 épaisseurs de gaze. Réparti en fiole de Kitasato à raison de 10 g, il est additionné de solution chloroformique de flavacoumarine (1 à 4 ml), de manière à obtenir des concentrations en toxique de 25, 50, 100, 150 et 200 μg par g de poids sec. Des témoins du solvant chloroformique sont réalisés de la même manière. Les fioles sont mises à l'étuve à 37 °C pendant 3 h : l'évaporation du solvant est complétée par une aspiration sous vide de 20 mn, puis par un nouveau séjour à l'étuve de 10 h, suivi d'un nouveau branchement de 20 mn sur la trompe à vide.

Le son de blé ainsi préparé est introduit dans des flacons de Borel, à raison de 2,5 g par flacon ; 10 vers de farine étant à leur tour disposés dans chaque récipient. La lecture est réalisée toutes les 24 h ; le contenu du flacon étant renversé sur une feuille de papier filtre, les animaux sont examinés un par un.

Le toxique ne possède apparemment aucun effet mortel pour ces larves : il n'entrave pas le passage à l'état nymphal, mais le nombre d'adultes apparus diminue en fonction de la teneur en flavacoumarine.

2. — MOLLUSQUES

Des escargots, *Helix aspersa*, ont été séparés par lots de 10. Enfermés dans de grands cristallisoirs de verre (diamètre 25 cm), ils ont reçu pour toute nourriture une feuille de papier filtre Prolabo de 90 mm de diamètre imprégnée, ou non, d'une solution de flavacoumarine. La teneur était, au départ, de 10 μg par feuille (jusqu'au 95^e jour), puis a été ensuite portée à 30 μg . Chaque jour, les déjections sont récoltées et stockées, les analyses étant réalisées aux temps précisés dans le tableau II, si bien que les dosages ont porté sur une série cumulée d'émissions. L'essai a duré 155 jours et n'a montré aucune différence entre lots témoins et lots expérimentaux, en ce qui concerne la digestion de la cellulose et l'évolution des courbes pondérales.

TABLEAU II

Elimination des flavacoumarines dans les déjections des escargots

Variétés de flavacoumarines	Jour d'analyse					
	Feuilles à 10 μg			Feuilles à 30 μg		
	15 ^e j	75 ^e j	90 ^e j	110 ^e j	130 ^e j	155 ^e j
En μg :						
B	0	0	0	4	0	1,5
G	0	traces	1	9	0,5	3,7
M	0	0	1,3	0,8	traces	1
Nouveau métabolite	0	0	0	+++	—	++

Cependant, 3 sujets du lot traité par les flavacoumarines sont morts après 3 mois. En début d'expérience, les excréments normaux présentaient sous les rayons ultraviolets de 3.600 Å une fluorescence jaune d'or, beaucoup moins vive à 2.500 Å. Elle était atténuée pour les animaux traités par les flavacoumarines qui, en revanche, produisaient une fluorescence bleutée très pâle. Les

différences se sont ensuite estompées. Pendant longtemps, aucun composé caractéristique n'apparaît, comme si tout le toxique était stocké, métabolisé ou détruit. Puis, les formes G et M sont excrétées et, avec les fortes doses, ou plutôt après le 110^e jour, comme si tout l'organisme était saturé, apparaît la forme B et également un métabolite, non encore décrit, de Rf supérieur à celui des flavacoumarines dont les valeurs pour trois des solvants dont nous nous servons habituellement (1) (2) sont les suivants :

Chloroforme : méthanol (95/5).....	0,65
Ether éthylique (100).....	0,67
Benzène : alcool : eau (46/35/19).....	0,48

Il n'est pas certain du reste que ce métabolite soit toxique. On observe, par ailleurs, une substance fluorescente bleutée, surtout nette chez les témoins et qui migre avec le front du solvant.

De quelques escargots prélevés régulièrement, les tissus ont été broyés en présence de sable de Fontainebleau et les flavacoumarines extraites. On y retrouve le dérivé fluorescent nouveau (tableau III).

TABLEAU III

Présence des flavacoumarines et de leur dérivé dans les tissus des escargots

	Jour de l'analyse			
	90	120	140	155
Poids de l'animal en g	9,30	9,35	4,31	8,50
Flavacoumarines en μ g :				
B	traces	1,2	0,30	0,20
G	2,7	4	0,35	0,50
M	1,4	2,5	traces	0,40
Nouveau métabolite	0	+++	0	++

Pour terminer, nous avons injecté à 6 sujets de 11 à 30 g, à travers la coquille et en une fois, 25 μ g dans l'hépatopancréas, sans que ces animaux en paraissent incommodés.

3. — BATRACIENS

Nous avons administré à des grenouilles, *Rana esculenta*, réparties par lots de 5, par voie intrapéritonéale ou dans les sacs lymphatiques

tiques ventraux 0,5 ml de solution physiologique renfermant, ou non, les flavacoumarines. On n'a pas obtenu, avec des doses totales allant de 1 à 25 μg , des mortalités sensiblement différentes de celles des témoins. La répétition des injections correspondant à des titres de 0,5 à 5 μg chaque fois pendant cinq jours du 5^e au 10^e jour, n'a pas changé le tableau. Mais une nette mortalité est obtenue avec des injections répétées de 25 μg par jour.

Les coupes histologiques des foies des survivants et des morts n'ont pas permis de voir les lésions si caractéristiques des flavacoumarines, retrouvées chez les Oiseaux et Mammifères, de prolifération des cellules épithéliales autour des canaux biliaires. On note seulement une congestion généralisée avec distension et remplissage par du sang de toutes les lacunes qui entourent les travées cellulaires. Cette lésion est précoce.

4. — MAMMIFÈRES

A. Chez le lapin domestique, *Oryctolagus cuniculus*, de race blanc du Bouscat, nous avons cherché à voir s'il existait une action irritative locale. Deux voies ont été utilisées :

a) *Voie oculaire* : pendant 8 mois, nous avons instillé, chaque jour, dans l'œil droit d'un lapin, 0,1 ml de soluté physiologique et, dans l'œil gauche, 1 à 3 μg du même soluté de flavacoumarine en solution dans 0,1 ml. Aucune action n'a été notée.

b) *Voie intradermique* : plusieurs essais ont été faits de façon à déterminer le rôle possible du support.

Avec des introductions répétées chaque jour aux mêmes points, des concentrations de 5, 10, 50 et 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de soluté physiologique, on observe, pour les deux teneurs les plus fortes, 15 heures après la première injection, une légère rougeur qui disparaît en 24 heures. Par la suite, cette congestion reste visible 3 à 5 heures seulement après chaque injection du toxique. Aucune induration durable n'est décelable.

Trois injections quotidiennes, suivies de deux hebdomadaires, à raison de 10 et 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ dans l'huile d'arachide donnent des résorptions lentes. 24 heures après chacune des trois premières injections, on note, pour les animaux traités, notamment avec 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, une induration nette avec rougeur débordant largement la papule centrale. Les différences avec les témoins s'estompent ensuite.

L'addition de flavacoumarines au glycérol augmente l'action irritative de celui-ci. Ainsi, 21 jours après injection d'une solution

à 50 $\mu\text{g/ml}$, reste-t-il encore une inflammation autour d'une induration avec point de nécrose central, alors que les témoins ne montrent plus aucune lésion.

B. L'effet léthal des flavacoumarines, mis en évidence par divers auteurs (5) (8) (9) sur divers types de cellules en culture a été recherché ici sur les leucocytes de cobaye.

1. — PRÉPARATION DE LA SUSPENSION DE POLYNUCLÉAIRES

Les polynucléaires sont recueillis aseptiquement après ponction intra-péritonéale chez le cobaye adulte. L'appel leucocytaire est induit par une double injection, par la même voie parentérale, de macération de viande stérile, préparée selon la formule de Casagne. Mis en suspension dans une solution de Ringer, les leucocytes sont dénombrés à la cellule de Thoma, l'ensemble des différentes opérations se déroulant à 37 °C et les liquides étant eux-mêmes ajustés à cette même température.

2. — PROCESSUS EXPÉRIMENTAL

Des solutions de Ringer, contenant ou non (tubes témoins) des aflatoxines sont réparties à volume égal (1 ml) dans les tubes de Kahn stériles. L'échelle des concentrations en flavacoumarines s'établit comme suit : 1, 5, 10 et 50 $\mu\text{g/ml}$.

Après dilutions convenables, la suspension de polynucléaires est distribuée dans chacun des tubes sous un volume de 0,1 ml. Le nombre de cellules varie de 500.000 à 1.500.000. La résazurine (en solution à 50 $\mu\text{g}/100$ ml) est ajoutée à raison de 0,1 ml par tube. Conservés à 37 °C, les portoirs sont examinés après 6 h et 18 h, et les cellules colorées au May-Grunwald-Giemsä.

3. — RÉSULTATS

Les cellules ne sont pas tuées et ne montrent pas de différence morphologique évidente sous l'influence du toxique. La réduction de la résazurine en résorufine, quoique lente, (elle n'est jamais visible dans les 8 premières heures) est nette et très progressive. Lorsque l'indicateur de potentiel rédox est introduit, une heure après la mise en contact du toxique avec les cellules vivantes, la décoloration est plus tardive. L'examen sous la lumière U. V. de λ : 3.650 Å montre par ailleurs, que la fluorescence caractéristique des flavacoumarines masque celle de la résazurine, qui émet, quand elle est seule, un beau rouge coquelicot.

TABLEAU IV

Réduction de la résazurine : lecture effectuée après 18 h de contact

Nombre de polynucléaires	Concentration en flavacoumarine				
	(témoin) Néant	1 µg/ml	5 µg/ml	10 µg/ml	50 µg/ml
500.000	+	±	±	—	—
650.000	++	+	+	—	—
800.000	+++	+++	+++	—	—
1.200.000	+++	+++	+++	±	—
1.500.000	+++	+++	+++	+	—

+++ : coloration rose pâle.
 ++ : coloration rose cyclamen.
 + : coloration rose cyclamen légèrement violacé.
 ± : coloration rose violacé.
 — : coloration bleue.

Complète dans le tube témoin, non modifiée par de faibles teneurs en toxique, la réduction de la résazurine est inhibée par des teneurs supérieures à 10 µg/ml, le blocage de la réaction s'effectuant d'autant mieux que le nombre de cellules est plus faible.

5. — CONCLUSIONS

L'exploration que nous venons de réaliser sur quelques spécimens du règne animal, tant en ce qui concerne une action irritative locale qu'une action létale générale, montre des sensibilités et des résistances variées aux flavacoumarines. Dans l'ensemble, les invertébrés se montrent assez indifférents, exception faite des daphnies qui ont là une position exceptionnelle. Le manque de fragilité est particulièrement net pour les escargots et les grenouilles, qui sont, d'ailleurs, pratiquement en état de survie au laboratoire, résultat qui ne nous surprend pas quand on connaît l'insensibilité de ces espèces pour beaucoup de substances qui sont très toxiques pour les mammifères.

Avec les polynucléaires de cobaye, il est possible de réaliser un test simple de diagnose relativement rapide et sensible.

Laboratoire de Microbiologie. U. E. R. des Sciences de la vie et du comportement. Université de Caen.

BIBLIOGRAPHIE

1. BOUTIBONNES (P.) et JACQUET (J.). — Sur la fréquence de l'aflatoxine et des *Aspergillus* dans les aliments. *C. R. Soc. Biol.*, 1969, **163**, 1118-1124.
2. BOUTIBONNES (P.), JACQUET (J.) et TEHERANI (A.). — Chromatographie rapide en couche mince des flavatoxines contenues dans les aliments. *Bull. Acad. Vét.*, 1969, **42**, 825-833.
3. BROWN (R.). — The effect of some mycotoxins on the brine shrimp, *Artemia salina*. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 1969, **46**, 119.
4. BROWN (R.), WILDMAN (J.) et EPPLEY (R.). — Temperature dose relationship with aflatoxin on the brine shrimp, *Artemia salina*. *J. of A. O. A. C.*, 1968, **51**, 905-906.
5. GABLICKS (J.), SCHAEFFER (W.), FRIEDMAN (L.) et WOGAN (G.). — Effect of aflatoxin B₁ on cell cultures. *J. Bact.*, 1965, **90**, 77.
6. JACQUET (J.) et BOUTIBONNES (P.). — Action des flavacoumarines (aflatoxines) sur les petits crustacés d'eau douce. Possibilité de création d'un test biologique. *Bull. Acad. Vét.*, 1970, **43**, 299-309.
7. — Effets des flavacoumarines (aflatoxines) sur quelques animaux et végétaux. *C. R. Soc. Biol.*, 1970, **164** (en cours de parution).
8. LEGATOR (M.) et WITHROW (A.). — Aflatoxin : effect on mitotic division in cultured embryonic lung cells. *J. of A. O. A. C.*, 1964, **47**, 1007.
9. LEGATOR (M.), ZUFFANTE (S.) et HARP (A.). — Aflatoxin : effect on cultural heteroploid human embryonic lung cells. *Nature*, 1965, **208**, 345.

Le Gérant : C. BRESSOU