

Recherche des flavacoumarines par chromatographie en couche mince. Importance de la discrimination des autres taches fluorescentes

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

La recherche des flavacoumarines (aflatoxines) est généralement faite à l'aide, après extraction dans un solvant approprié, d'une chromatographie en gel de silice sur plaques. Certaines de celles-ci sont d'ailleurs vendues toutes prêtes dans le commerce (Merck) ce qui évite d'avoir à les fabriquer. Le liquide de développement des chromatogrammes qui paraît le meilleur semble actuellement le mélange éther : méthanol : eau (96 : 3 : 1).

Nous avons, de notre côté, tenté la miniaturisation sur lame d'observation microscopique (3) (1) (12) et montré l'intérêt de la réalisation simultanée de 5 chromatogrammes avec des solvants différents :

1. — éther (100),
2. — chloroforme : méthanol (95 : 5),
3. — chloroforme : acétone (90 : 10),
4. — méthanol : eau (60 : 40),
5. — benzène : alcool : eau (46 : 35 : 19).

Par ailleurs, les flavacoumarines sont sensibles à la lumière (13) (14) (6) et nous avons établi que c'était surtout la fraction ultraviolette qui accompagne les rayons lumineux qui intervenait (6).

La destruction est très rapide pour les petites quantités : presque instantanée (en 10 minutes au plus), pour les doses qui sont à la limite de l'observation des chromatogrammes, soit 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dans le produit étudié avec une prise d'essai de 20 g au départ. Malgré tout, en quelques heures (3 ou 4, temps que dure l'ensemble de l'analyse) des doses plus fortes, de l'ordre de 0,065 μg sur la lame de verre, ce qui correspond, toujours avec une prise d'essai de 20 g, à une richesse du produit de départ de 1.300 $\mu\text{g}/\text{kg}$, ce qui est beaucoup, sont encore capables de diminuer très sensiblement. On peut dire, en général, d'ailleurs, que la fragilité est d'autant plus grande que les quantités sont moins importantes, mais il y a toujours une certaine destruction. De plus, la sensibilité est particulièrement

nette dans les chromatogrammes en gel de silice et dans les liquides hyalins et transparents (ce n'est pas le cas du lait qui assure une certaine protection au toxique). De toutes façons, il nous paraît absolument indispensable, non seulement, de conserver à l'obscurité et dans des flacons bruns les provisions de flavacoumarines, mais aussi, d'opérer, de suite, sans interruption, toutes les manipulations d'extraction, purification, chromatographie et lecture, et cela dans une pièce obscure munie de doubles rideaux noirs (rideaux de cinéma) éclairée faiblement par deux veilleuses jaunes. Il faut, également, utiliser de la verrerie de laboratoire inactinique. Sans cette précaution, on obtiendrait des résultats systématiquement faux, et faux par défaut, parfois même très fortement erronés.

Quand on applique ces méthodes à l'étude des produits naturels ou à celle des milieux de culture des champignons, on constate qu'il y a aussi, sur les chromatogrammes, beaucoup d'autres taches fluorescentes qui ne sont pas des flavacoumarines, et dont certaines se rapprochent de celles-ci par leurs Rf. Il y a donc lieu de les différencier. On trouve de ces corps dans les arachides, l'avoine, le manioc, les carottes moisis, mais non les fraîches, les jus de fermentations des moisissures, dont bien sûr, les *Aspergillus*. Nous en avons constaté et signalé, notamment, dans les fromages de Livarot, Saint-Nectaire, Tome de Savoie, le tabac, le café, le vin de Sauternes (12). Pour en rester aux produits qui peuvent intéresser les docteurs-vétérinaires, nous n'envisagerons que certains aliments des animaux (carottes moisis, manioc) ou les produits d'origine animale, dont ils ont la surveillance (certains fromages, par exemple).

L'emploi de la méthode à 4 temps que nous recommandons (12) doit presque toujours lever les doutes et résoudre les difficultés. Il s'agit de :

- 1^{er} temps : extraction des flavacoumarines des produits étudiés,
- 2^e temps : chromatographie différentielle à 5 solvants,
- 3^e temps : contrôle chimique de la réalité comme flavacoumarines des taches aperçues sur les chromatogrammes,
- 4^e temps : tests biologiques divers.

I. — PRODUITS DESTINÉS A L'ALIMENTATION ANIMALE

Il est possible de dresser de véritables cartes pour chaque type de corps étudié, en figurant, de gauche à droite, les résultats des chromatogrammes obtenus avec les solvants et en allant constamment de 1 à 5. Celles des flavacoumarines serviront de témoins auxquels on comparera les autres (fig. 1). Cela n'autorise pas,

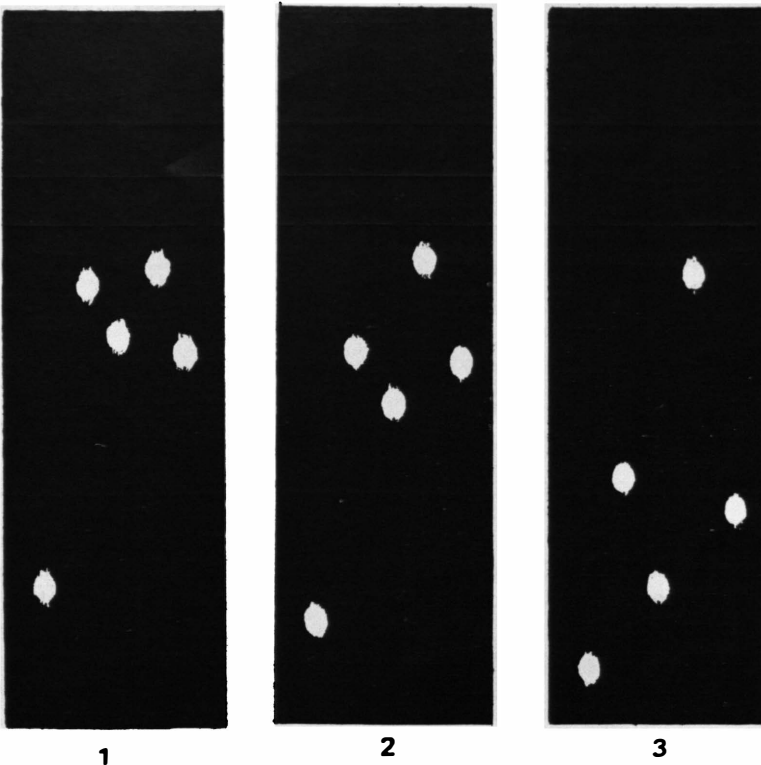


FIG. 1. — Taches caractéristiques des flavacoumarines obtenues par chromatographie en couche mince par les 5 systèmes de solvants que nous utilisons.

De gauche à droite :

- Ether (100).
- Chloroforme - méthanol (95 : 5).
- Chloroforme - acétone (90 : 10).
- Méthanol - eau (60 : 40).
- Benzène - alcoo - eau (46 : 35 : 19).

1. — Flavacoumarine B.
2. — Flavacoumarine G.
3. — Flavacoumarine M.

cependant, à réaliser les chromatogrammes sans témoin d'aflatoxine pure. On constatera, alors qu'avec l'avoine normale, les carottes moisies ou le maïs moisi (l'action des champignons ici est absolument indispensable pour faire produire les substances fluorescentes), le manioc... apparaissent des fluorescences nouvelles dont on

ne peut affirmer encore qu'il s'agit de mycotoxiques. Le tableau I en montre les Rf respectifs.

TABLEAU I

Produit fluorescent	Solvant				
	1	2	3	4	5
Flavacoumarines B ..	0,20	0,62	0,55	0,65	0,53
G ..	0,15	0,52	0,45	0,65	0,50
M ..	0,08	0,35	0,20	0,64	0,33-0,25
Avoine.....	0,86	0,21-0,36 0,73	0,32	0,75	0,36
Maïs moisi	0,05-0,25 0,35	0,16-0,33 0,47	0,17-0,41 0,55	0,01-0,65	0,36-0,42 0,49
Manioc	0,47-0,49	0,50	0,45-0,47	0,62-0,65	0,50
Carottes moisies.....	0,64	0,51	0,69-0,39	0,69	0,59-0,50 0,39

D'un simple coup d'œil, on s'aperçoit qu'il n'y a aucune difficulté à repérer les taches fluorescentes de l'avoine, du maïs, et des carottes moisies comme non identiques aux flavacoumarines (fig. 2 et 3).

Le problème est plus délicat avec le manioc, dont les échantillons que nous avons en mains donnent tous une tache bleue très intense, dont l'extinction est difficile à obtenir par dilution, mais 4 Rf sur 5 sont très proches, sinon semblables, à ceux des flavacoumarines, notamment de la flavacoumarine G. Seul, l'éther montre que l'on a affaire à autre chose, les aflatoxines restant sur place, alors que le produit du manioc a une migration certaine (fig. 3).

L'emploi des tests biochimiques montre des différences évidentes. On constate, en effet :

1° qu'avec vaporisation d'acide nitrique à 5 p. 100, il n'y a aucune modification de la couleur de la tache qui reste bleu vif, tandis que les flavacoumarines donnent une masse jaune, là où était le spot,

2° la vaporisation d'eau de javel à 10 p. 100 produit une destruction plus rapide que celle des flavacoumarines,

3° la vaporisation d'eau oxygénée à 50 volumes réduit seulement de 20 p. 100 environ la fluorescence qui ne disparaît jamais complètement, même après plusieurs vaporisations, alors que les flavacoumarines sont plus rapidement et plus fortement atténuées,

4° la vaporisation de permanganate de potassium 0,1 N fait disparaître immédiatement la fluorescence, avec réduction importante du réactif, ce qui est semblable aux flavacoumarines,

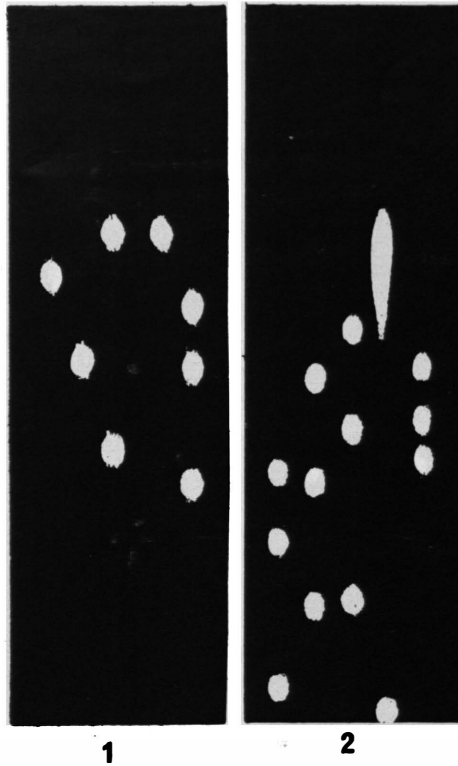


FIG. 2. — Taches fluorescentes observées sur produits végétaux mois (les produits sains sont dépourvus de ces substances caractéristiques). (Mêmes systèmes de solvants que sur la fig. 1).

1. — Carottes moisies.
2. — Maïs moisi.

5° l'action des vapeurs d'ammoniac transforme, après une minute d'exposition, la fluorescence bleutée primitive en fluorescence jaun-vert, alors que les flavacoumarines perdent seulement la moitié environ de leur fluorescence sans modification de couleur.

Nous ne nous sommes pas livrés à l'étude des tests biologiques divers dont, d'ailleurs, nous avons mis un certain nombre au point (4) (5) (7) (8). Nous n'avons examiné pour le moment que le test microbiologique à *Bacillus stearothermophilus*, pour constater que le grattage d'une tache fluorescente en gel de silice obtenue après dépôt de 2,5 μ l d'un extrait en chloroforme : acétone (99 : 1) de 20 g

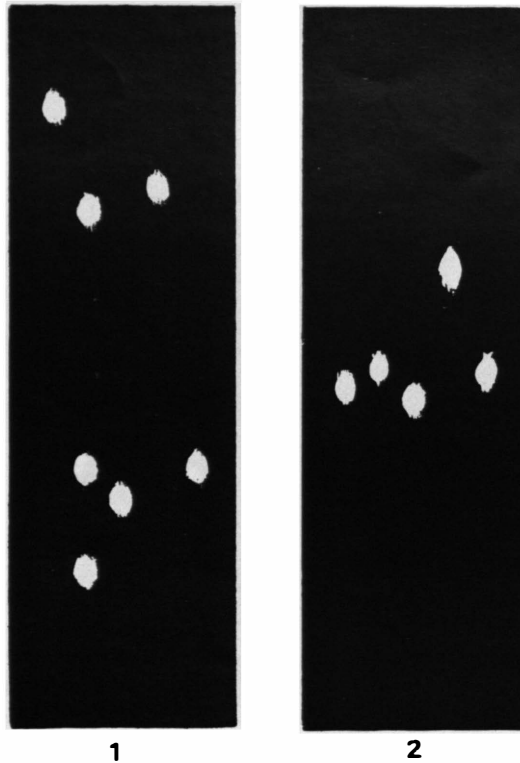


FIG. 3. — Taches fluorescentes retrouvées constamment sur les produits végétaux (Mêmes systèmes de solvants que sur la fig. 1).

1. — Avoine.
2. — Manioc.

de farine de manioc concentré sous 1 ml, déposé sur culture en boîte de Pétri entraînait une auréole d'inhibition très nette, de 9 à 11 mm de diamètre, beaucoup plus grande que celle des flavacoumarines. Nous avons fait une remarque analogue avec le produit fluorescent du vin de Sauternes, qui est probablement un métabolite de la coumarine produit par la moisissure noble du grain, *Botrytis cinerea*, qui, lui aussi, est beaucoup plus inhibiteur des bacillacées que les flavacoumarines. Ce test n'est donc pas spécifique.

La preuve finale de la non-identité avec les flavacoumarines est fournie par l'examen du spectre d'absorption au spectrophotomètre UNICAM (fig. 4) qui donne des résultats très différents.

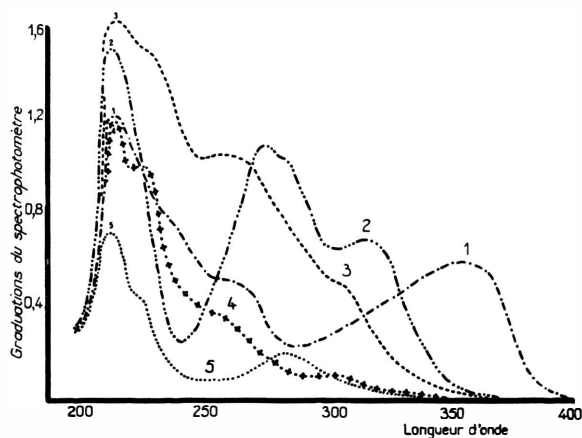


FIG. 4. — Courbes d'absorption au spectrophotomètre « Unicam » de substances fluorescentes diverses.

Solvant : alcool éthylique.

1. — Flavacoumarines B et G.
2. — Coumarine.
3. — Extrait de Saint-Nectaire.
4. — Extrait de manioc.
5. — Extrait d'urine d'un rat qui a reçu une injection par voie intramusculaire avec 1.000 μg de coumarine.

Une dernière démonstration, enfin, s'il en était nécessaire, pourrait être apportée par la sensibilité à la lumière des substances fluorescentes. Nous avons déjà insisté sur la photolabilité des flavacoumarines. Le corps fluorescent du manioc est encore plus sensible, comme le montre le tableau II.

TABLEAU II

Pourcentage de destruction du dérivé fluorescent du manioc sous l'influence de la lumière

Conditions expérimentales	Temps en heures					
	1	2	3	4	5	6
Obscurité	0	0	0	0	0	0
Laboratoire	50	100	100	100	100	100
Lampe UV 3650 Å	50	80	90	100	100	100

La sensibilité thermique, est, elle-même, différente et nettement plus grande que celle des flavacoumarines (tableau III).

TABLEAU III

Pourcentage de destruction par chauffage, à l'obscurité, du dérivé fluorescent du manioc

Température en degrés Celsius	Temps en heures					
	1	2	3	4	5	6
20	0	0	0	0	0	0
55	0	0	0	0	0	0
80	0	60	60	60	60	60
150	0	90	90	95	95	100

Quant à l'origine et la nature de cette substance, nous n'avons pas examiné un nombre suffisamment grand de farines de manioc pour être fixés. Est-elle constante et inhérente à la plante elle-même ? Est-elle inconstante, provoquée au moins dans les couches extérieures, par la présence d'*Aspergillus flavus* si fréquent dans les sols exotiques, par exemple ? CLERCK et CAURIE (2) soulignent l'existence de cette contamination mycélienne qui entraînerait des modifications biochimiques tandis que STANTON et WALBRIDGE (15) signalent que le composé toxique qui en résulte est localisé dans les couches externes de la racine.

Nous avons examiné 7 échantillons de tapioca, qui dérive du manioc, et constaté que tous renfermaient ce dérivé fluorescent : il est cependant nécessaire, pour le mettre en évidence, d'humidifier très fortement la poudre (5 à 10 ml d'eau pour 20 g), avant d'ajouter le solvant d'extraction. Par ailleurs, nous avons cultivé sur farine de manioc 2 souches toxicogènes d'*A. flavus* et deux souches non toxicogènes du même champignon. Avec les deux premières seules, nous avons retrouvé des flavacoumarines à l'état de très petites quantités seulement ; jamais nous n'avons fait apparaître le dérivé fluorescent décrit ici dans le manioc. Il semble donc bien qu'il s'agisse d'un produit et sans rapport avec le parasitisme.

Par ailleurs, nous ne pouvons, pour l'instant, affirmer qu'il s'agit d'un toxique nouveau, sans des essais supplémentaires. Avec le test daphnies que nous avons précédemment étudié (5), la mortalité provoquée par l'extrait de manioc est faible (20 % en 24 heures, avec 100 unités de fluorescence par nul ; 30 %

en 48 heures avec 10 UF par nul ; 60 % en 48 heures avec 100 UF). Le nombre de daphnies apparues par parthénogénèse n'est pas diminué par rapport au témoin.

Nous avons, par ailleurs, injecté à des rats de la coumarine ; ils éliminaient, alors, dans leur urine, un corps fluorescent nouveau, que l'on retrouve, aussi, dans les extraits de foin et de luzerne, voire, dans les cultures d'*Escherichia coli*, *Bacillus nebelilis* et *Welchia perfringens* réalisés en présence de coumarine. Ce composé est différent de la substance fluorescente trouvée dans le manioc.

II. — PRODUITS LAITIERS

Dans notre étude antérieure, présentée devant cette Académie, nous avons signalé la constance de taches fluorescentes dans certains fromages : Livarot, Tome de Savoie, Saint-Nectaire. Nous savions déjà que les corps ainsi repérés n'étaient pas des flavacoumarines, ni pour la Tome de Savoie, ni pour le Livarot (9). Le Saint-Nectaire a fait l'objet d'études ultérieures plus poussées, par chromatographie différentielle et spectrophotométrie. On constate alors, tant pour les Rf, que pour les courbes d'absorption que ces substances n'ont rien à voir avec les aflatoxines.

D'une façon générale, d'ailleurs, l'origine de ces substances dans les fromages pourrait être triple :

- présence de flavacoumarines dans les aliments, notamment les tourteaux d'arachide et élimination par le lait,
- transformation par l'organisme animal des coumarines existant dans de nombreux végétaux (flouve odorante, mélilot, etc...) et élimination avec le lait,
- après fabrication, installation d'*Aspergillus* producteurs sur lait caillé et fromages.

Sur le premier point, nous avons des idées précises sur la fréquence de contamination des tourteaux d'arachides (85 p. 100). Les taux sont souvent très faibles, mais ils atteignent parfois des teneurs élevées. Et, comme nous avons constaté la présence dans le lait de flavacoumarine M lorsque les vaches étaient nourries avec des aliments qui en renfermaient 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$, on comprend bien l'influence de cette alimentation sur la contamination de la sécrétion mammaire (11).

Pour le deuxième point, qui a été soulevé devant nous parce que sur un certain nombre d'échantillons de lait, nous trouvions une

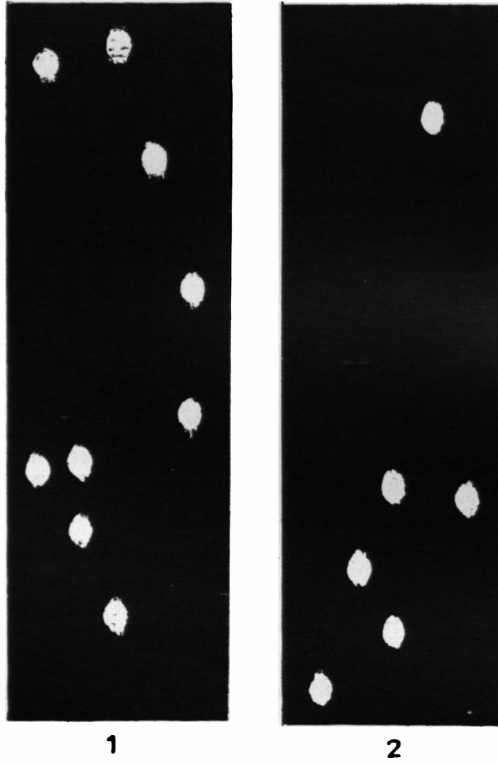


FIG. 5. — Substances fluorescentes des fromages (Mêmes systèmes de solvants que la fig. 1).

1. — Livarot.
2. — Saint-Nectaire.

tache fluorescente dont les Rf et les autres propriétés étaient identiques à celles des flavacoumarines B, et parfois G, nous avons injecté de la coumarine à des rats, et mis en culture *A. flavus* sur milieu de Czapek-Dox en présence de cette même substance. On obtient alors, dans les deux cas, un autre dérivé fluorescent sur lequel nous apporterons des précisions ultérieures mais qui n'est ni une des flavacoumarines connues, ni la tache du manioc (fig. 6).

Quant au troisième point, malgré de nombreuses recherches, portant actuellement sur plus de 150 fromages, nous n'avons jamais trouvé dans ces aliments, la moindre trace de flavacoumarines. Ils sont donc particulièrement sains à cet égard. Il faut dire,

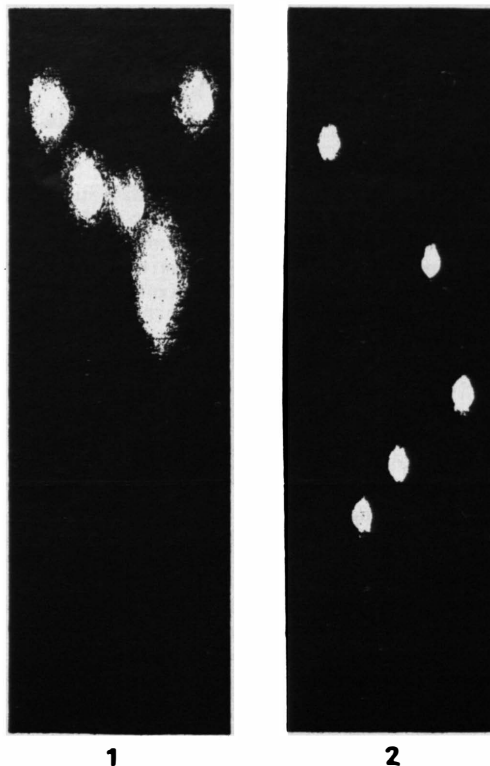


FIG. 6. — Taches fluorescentes de la coumarine et de son dérivé (Mêmes systèmes de solvants que sur la fig. 1).

1. — Coumarine (les taches sont bleutées, diffuses et très peu intenses).
2. — Dérivé retrouvé dans l'urine d'un rat qui a reçu une injection intramusculaire de 1.000 μg de coumarine (extraction réalisée 24 h après l'injection) ou dans une culture d'*Aspergillus flavus* sur milieu additionné de 0,01 p. 100 de coumarine.

d'ailleurs, qu'ils sont très rarement l'objet d'une pousse de la part des *Aspergillus*, et restent essentiellement le domaine, d'abord, des *Penicillium*, ensuite des Mucorales. Sur le Saint-Nectaire, en particulier, ce sont des *Mucor* que l'on trouve constamment.

En conclusion, dans la chromatographie sur plaque mince des flavacoumarines, il faut porter grande attention aux taches fluorescentes d'autres corps qui méritent d'être séparées et qui se trouvent, constamment ou parfois seulement, dans quelques aliments. La méthode générale que nous avons proposée (12) y parvient bien.

L'emploi des grandes plaques, à condition de faire varier les solvants de développement, permet, également, de repérer les substances parasites (fig. 7). Enfin, bien que l'on doive constamment réaliser

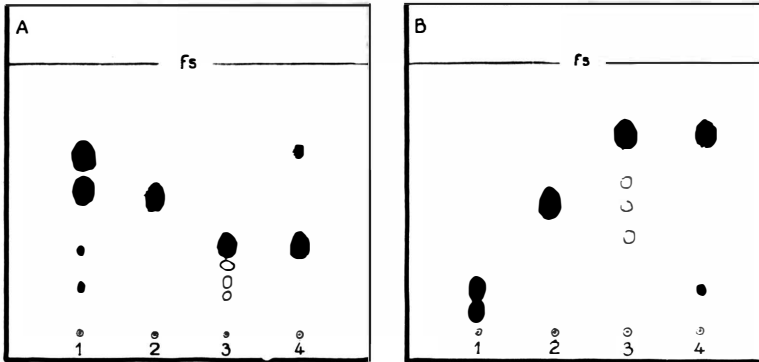


FIG. 7. — Chromatographie de substances fluorescentes sur plaque de gel de silice « G » (Merck), avec deux systèmes de solvants :

A) Chloroforme : méthanol (95 : 5).

B) Ether éthylique (100).

fs) Front du solvant.

1) Mélange de flavacoumarines.

2) Extrait de manioc.

3) Urine de rat, 24 h après injection de 1.000 µg de coumarine par voie intramusculaire.

4) Extrait d'une culture de 8 jours d'*A. flavus* toxigène sur milieu de Czapek-Dox additionné de 0,01 p. 100 de coumarine.

la chromatographie en présence d'un témoin aflatoxine, il faut ajouter que dans la grande majorité des cas, cette technique doit être complétée par des tests chimiques de contrôle et même parfois des essais biologiques.

(Laboratoire de Microbiologie — U. E. R.
des Sciences de la Vie et du Comportement
— Université de Caen).

BIBLIOGRAPHIE

1. BOUTIBONNES (P.), JACQUET (J.) et TEHERANI (A.). — Chromatographie rapide en couche mince des flavatoxines contenues dans les aliments. *Bull. Acad. Vét.*, 1969, **42**, 825.
2. CLERCK (G.) et CAURIE (M.). — Biochemical changes caused by some *Aspergillus* species in root tuber of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Trop. Sc.*, 1968, **10**, 149.

3. JACQUET (J.) et BOUTIBONNES (P.). — Procédé de détection rapide des flavatoxines par chromatographie en couche mince. Application à la microbiologie alimentaire. *C. R. Acad. Agric.*, 1967, **153**, 1 244.
4. JACQUET (J.) et BOUTIBONNES (P.). — Action de l'aflatoxine sur les cellules microbiennes. *C. R. Soc. Biol.*, 1969, **163**, 1 574.
5. 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.
6. JACQUET (J.) et BOUTIBONNES (P.). — Recherches sur les flavatoxines ou mieux flavacoumarines. *Rev. Immunol.*, 1970, **34**, 245.
7. JACQUET (J.) et BOUTIBONNES (P.). — Effets biologiques des flavacoumarines (aflatoxines) sur quelques animaux et végétaux. *C. R. Soc. Biol.*, 1970, **164**, 2239.
8. JACQUET (J.) et BOUTIBONNES (P.). — Nouvelles recherches sur les effets des flavacoumarines sur les animaux. *Bull. Acad. Vét.*, 1971, **44**, 65.
9. JACQUET (J.), BOUTIBONNES (P.) et TEHERANI (A.). — Sur la présence des flavatoxines dans les aliments des animaux et dans les aliments d'origine animale destinés à l'homme. *Bull. Acad. Vét.*, 1970, **43**, 35.
10. JACQUET (J.), BOUTIBONNES (P.) et TEHERANI (A.). — Fréquence actuelle des flavacoumarines dans les aliments du bétail. *C. R. Acad. Agric.*, 1970, **156**, 187.
11. JACQUET (J.), BOUTIBONNES (P.), TEHERANI (A.) et TANTAOUI (A.). — Sur la fréquence des moisissures du genre *Aspergillus*. Aperçu sur la présence des flavacoumarines (aflatoxines) dans les aliments. *Bull. Acad. Nat. Méd.*, 1971, **155**, 268.
12. JACQUET (J.), BOUTIBONNES (P.) et TEHERANI (A.). — Méthode simple de recherche et appréciation quantitative rapides des flavacoumarines (aflatoxines). *Ind. Alim. Agric.*, 1971, **88**, 5 et 689.
13. LIJINSKY (W.) et BUTLER (W.). — Purification and toxicity of aflatoxin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1966, **123**, 151.
14. PURCHASE (I.) et STEYN (N.). — Estimation of aflatoxin M in milk. *J. of A. O. A. C.*, 1967, **50**, 363.
15. STANTON (W.) et WALBRIDGE (A.). — Fermented food processes. *Proc. Bioch.*, 1969, **4**, 45.