

Compte rendu du Symposium « Mycotoxines et alimentation »,

QUI S'EST TENU LE 24 OCTOBRE 1969,
AU MINISTÈRE DES AFFAIRES SOCIALES I.N.S.E.R.M.
44, CHEMIN DE RONDE, 78 - LE VESINET
D.G.R.S.T. ACTIONS CONCERTÉES MYCOTOXINES
DU 4^e PLAN REPRISES PAR L'I.N.S.E.R.M.

par J.-P. PETIT

A. TITRES DES CONFÉRENCES

I. AFLATOXINES

- a) *Conditions de production de l'aflatoxine.*
1. Influence de divers traitements physiques des spores d'*A. flavus* sur l'aptitude des cultures à produire des toxines - A. JEMMALI et A. GUILBOT (I.N.R.A. Station de Biochimie et de Physico-Chimie de Céréales).
 2. Influence des composants du milieu de culture sur la production de la toxine - A. GUILBOT et M. JEMMALI (I.N.R.A.. Station de Biochimie et de Physico-Chimie des Céréales).
 3. Production d'aflatoxine en culture statique - P. LAFONT et J. LAFONT (I.N.S.E.R.M., Laboratoire de Toxicologie Alimentaire).
- b) *Aflatoxine et productions animales.*
4. Influence de l'aflatoxine sur les facultés reproductrices du coq et de la poule *Gallus gallus L.* - V. de ANDRES et C. CALET (I.N.R.A., Station de Recherches Avicoles).
 5. Effet de l'aflatoxine sur les fermentations du rumen - P. M. FEHR et J. DELAGE (Institut National Agronomique).
 6. Répercussions de l'ingestion d'aflatoxine sur le lapin en croissance - P. M. FEHR, C. RICHIR et J. DELAGE (Institut National Agronomique et Faculté de Médecine de Bordeaux).
 7. Malformations chez les *Aspergillus* et production d'aflatoxine - J. JACQUET et P. BOUTIBONNES (Faculté des Sciences de Caen).
- c) *Effets physico-pathologiques de l'aflatoxine.*
- Action de l'aflatoxine sur la cellule hépatique du rat.
8. 1^o Aspect morphologique - C. FRAYSSINET, W. BERNHARD et C. LAFARGE (Institut de Recherches Scientifiques sur le Cancer).
 9. 2^o Aspect biochimique : inhibition des synthèses nucléiques - C. LAFARGE et C. FRAYSSINET (Institut de Recherches Scientifiques sur le Cancer).
 10. Expériences avec l'aflatoxine B sur les insectes - A. VEY (I.N.R.A., Station de Recherches Cytopathologiques).

II. NOUVELLES MYCOTOXINES

11. Analyse mycologique systématique d'aliments suspects - C. MOREAU et J. PELHATE (Faculté des Sciences de Brest).
12. La toxine B3 d'*A. flavus* - C. FRAYSSINET et P. LAFONT (Institut de Recher-

ches Scientifiques sur le Cancer et Laboratoire de Toxicologie Alimentaire).

La nidulotoxine - P. et J. LAFONT et C. FRAYSSINET (Laboratoire de Toxicologie Alimentaire et Institut de Recherches Scientifiques sur le Cancer).

B. COMPTE RENDU DES CONFERENCES

I. CONDITIONS DE PRODUCTION DE L'AFLATOXINE

1. Influence de divers traitements physiques des spores d'*A. flavus* sur l'aptitude des cultures à produire des toxines

Il s'agit de traitements physiques utilisés en technologie alimentaire. Dans le cas des céréales deux sortes de traitements sont appliqués :

- le séchage à 60° pendant des temps variables;
- l'irradiation gamma (désinsectisation).

a) Action de la température

Le maximum d'action est noté entre 60 et 120 minutes d'exposition à 60°, il y a une augmentation très nette de la toxino-génèse.

b) Action des radiations gamma

Entre 100 et 150 KR on obtient une très nette augmentation de la toxino-génèse qui cependant diminue après irradiation à 50 KR.

Cette toxino-génèse exacerbée redevient nulle après 3 à 4 repiquages de la souche irradiée, il ne s'agit donc pas d'une sélection.

Ce traitement s'appliquait aux souches toxino-gènes, en ce qui concerne les souches non toxino-gènes, une irradiation d'environ 100 KR suffit à les faire devenir toxino-gènes.

L'importance de ces remarques est soulignée par le fait que, lors de la désinsectisation, on expose les graines à 70 KR.

2. Influence des composants du milieu de culture sur la production de la toxine

Les milieux utilisés comportent en général :

- des amidons,
- des concentrats de maïs,
- des broyats plus ou moins fins de riz et d'arachide,
- des produits issus de maïs industriel (semouleries, amidonneries).

L'humidité relative varie de 30 à 95 p. 100. On a remarqué que les germes des graines sont plus efficaces que leur son ou leur farine.

Ce sont les germes de maïs et de blé secs qui donnent le plus d'aflatoxine B₁. Mais on remarque une baisse de la quantité d'aflatoxine B₁ à partir des 4^e et 5^e jours de culture (fig. 1).

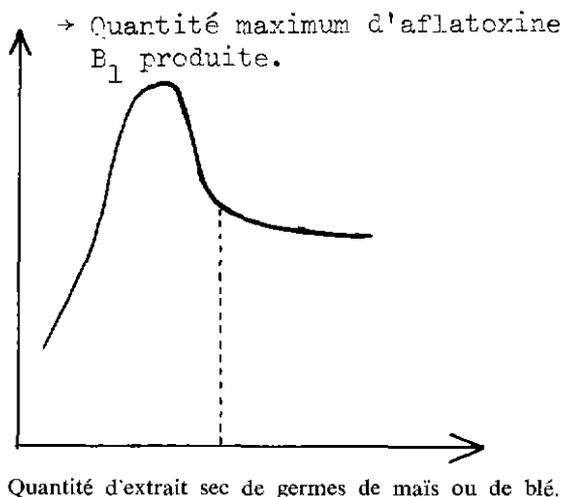


Fig. 1.
La production d'aflatoxine en culture en fonction de la quantité d'extraits secs de germes de blé ou de maïs.

En utilisant des germes délipidés on constate que la quantité d'aflatoxine B1 augmente à mesure qu'on remet des lipides, cependant s'il y en a trop la qualité rediminue.

En conjuguant l'action de l'irradiation γ et des lipides des germes de blé on peut doubler la production maximale d'aflatoxine B1.

De la même façon les extraits aqueux des germes de blé additionnés de zcapek modifié augmentent également la quantité d'aflatoxine B1 produite.

3. Production d'Aflatoxine en cultures statiques

Elles sont faites sur milieux naturels ou synthétiques. On constate de grosses variations du taux d'aflatoxine B1 au cours du temps en fonction de la durée d'incubation à 25° C. Le milieu synthétique est du zcapek modifié (BRIAND et Collab.) avec 2 p. 1000 d'aspargine.

Les cultures sont réalisées en flacons sous couche d'un centimètre d'épaisseur. L'inoculum est fait de spores mélangées à de petites quantités de poudre de liège extraites au soxhlet pour les délipider. L'extraction est faite à l'acétone, au méthanol, et à l'hexane, l'aflatoxine B se retrouvant dans la fraction méthanolique, on chromatographie en couches minces en solvant méthanol chloroforme (95 : 5).

Le dosage est fait par extinction de fluorescence et par inoculation à des œufs de poulets embryonnés.

Les trois souches isolées ont toutes montré deux sommets dans le taux d'aflatoxine B1 (fig. 2). Les dosages étaient faits tous les jours pour rechercher la signification de ces deux maximums. Leurs différences sont significatives (T de Student pour moins d'un p. 100). On avance l'hypothèse d'un précurseur utilisé par le champignon lors de la différenciation des phialides.

Il y a de fortes productions d'aflatoxine *in vitro* avec des cultures statiques (sans agitation, ni aération) mais il faut choisir avec précision le moment de l'extraction.

Des populations provenant d'un clone pur produisent des cultures filles qui donnent des quantités variables d'aflatoxine.

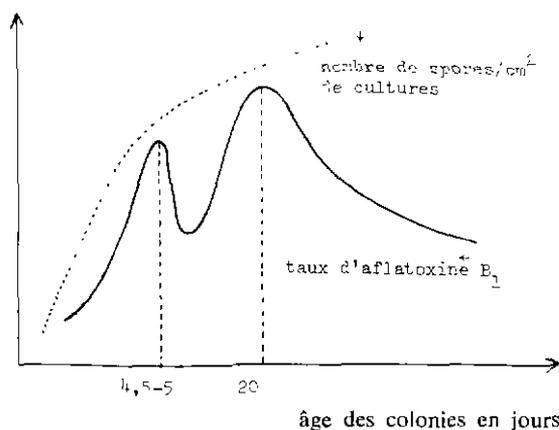


Fig. 2.

Comparaison de l'évolution du nombre de spores produites par cm² de culture et du taux d'aflatoxine B₁ en fonction de l'âge des colonies.

On remarque qu'un tiers de l'aflatoxine totale est sous forme dispersée dans les milieux de cultures liquides à l'état absorbé sur des particules de faibles volumes. Les deux tiers se trouvent dans les mycéliums.

Il se forme des pigments jaunâtre-brun sur les vieilles cultures avec une variation inverse du taux d'aflatoxine. Une remarque analogue avait été faite lors du premier Symposium par J. P. PETIT : l'emplacement invisible des spots d'aflatoxine sur les chromatogrammes brunit avec le temps.

II. AFLATOXINE ET PRODUCTIONS ANIMALES

4. Influence de l'Aflatoxine sur les facultés reproductrices du coq et de la poule *Gallus gallus L.*

A la dose de 300 γ par jour, il y a diminution de la ponte puis retour à la normale. A partir de 500 γ par jour, il y a diminution de la ponte sans rémission. Cet effet s'exerce sur le nombre total d'œufs pondus mais non pas sur le poids de chaque œuf.

Il y a d'abord diminution des lipides du jaune au début du traitement. Ceci correspond au fait qu'ils sont fabriqués par le foie. L'aflatoxine influence la synthèse des protéines, or ces lipides sont transportés sous forme de lipoprotéines.

Il n'y a aucune modification des protéines du jaune. Il y a diminution des protéines du

blanc après le traitement, toujours à cause de l'influence de l'aflatoxine sur la synthèse des protéines. L'étude des lipides du foie démontre ce fait. En particulier on constate une diminution de l'albumine de l'œuf.

Sur les reproducteurs, pour les femelles il y a diminution du nombre d'œufs, pour les mâles baisse de l'aptitude à la reproduction. Le taux des œufs viables diminue de 8 p. 100 par l'irradiation des mâles et de 15 p. 100 par irradiation des mâles et des femelles.

Au niveau du sperme, il y a diminution du nombre des spermatozoïdes vivants et diminution de la mobilité des survivants.

5. Effets de l'Aflatoxine sur les fermentations du rumen

L'aflatoxine diminue la cellulolyse, de la même façon il y a diminution de la production totale des acides gras volatils. Le pourcentage d'acide acétique diminue tandis que celui d'acide propionique augmente. Les Auteurs insistent sur le fait que cette diminution d'acide acétique a pour corollaire la diminution de la production laitière, ce qui semble contestable. L'amminogénèse diminue également, parallèlement à la cellulolyse.

Tout ceci est observé pour 0,05 µg. à 0,5 µg. d'Aflatoxine B1.

6. Répercussion de l'ingestion d'Aflatoxine sur le lapin en croissance

Le lot témoin est constitué de telle sorte qu'il absorbe la même quantité d'aliments que le lot recevant l'aflatoxine mais le lendemain, c'est le seul moyen de réaliser un témoin alimentaire réel.

La consommation alimentaire des lapereaux est d'abord identique à celle du lot témoin, puis elle diminue. La croissance baisse. La DL 50 est de 0,35 à 0,40 µg. par kg de poids vif.

On constate des séquelles à partir de 2 à 4 mois de régime toxique même si celui-ci a cessé et quelle que soit l'alimentation administrée ensuite.

On retrouve de l'aflatoxine B dans le sang, l'urine et la bile. On trouve aussi de l'aflatoxine dans le foie et les reins qui sont le siège de diverses lésions. En conclusion la sensibilité du lapin peut être comparable à celle du caneton à

ceci près que ses réponses individuelles sont très hétérogènes.

7. Malformations produites chez les *Aspergillus* par l'Aflatoxine

Il s'agit en montrant des photomicrographies de mettre en évidence des structures particulières de certaines cultures de champignons producteurs de toxines. Les Auteurs insistent sur le terme « Flavatoxine » pour les moisissures toxigènes qu'ils cultivent en milieu aéré avec agitation lente sur lait et zcapeak. L'agitation favorise le développement des mycéliums qui sont très épais et on obtient jusqu'à 500 µg. de « Flavatoxine B1 » par ml de cultures.

Le lieu d'accumulation de la toxine est la partie terminale de l'appareil sporifère. Les dimensions de ces parties qui deviennent sphériques et grossissent considérablement (60 µ) sont parallèles aux taux de « Flavatoxine ». On observe des images de pinocytoses avant le développement maximal des sphérocytes (fig. 3, 5). Des titrages effectués dans les spores montrent que c'est là le lieu d'accumulation de la toxine de type B et G.

Sur des souches non toxigènes cultivées avec de la « Flavatoxine » en milieu liquide ou gélifié, on observe un nombre élevé de déformations du mycélium.

III. EFFETS PHYSIOPATHOLOGIQUES DE L'AFLATOXINE

8. Actions de l'Aflatoxine sur la cellule hépatique du rat. Aspects morphologiques

Les lésions provoquées par l'aflatoxine diffèrent selon les espèces animales. On rencontre essentiellement 3 manifestations :

- Hépatite,
- Cirrhose,
- Cancer.

Le rat supporte 2 p.p.m. sans troubles extérieurs. Mais 1 ou 2 ans plus tard un cancer se déclenche, sa DL 50 est de 7 mg par kg.

Pour le singe dès 0,015 p.p.m. on observe des signes d'intoxication.

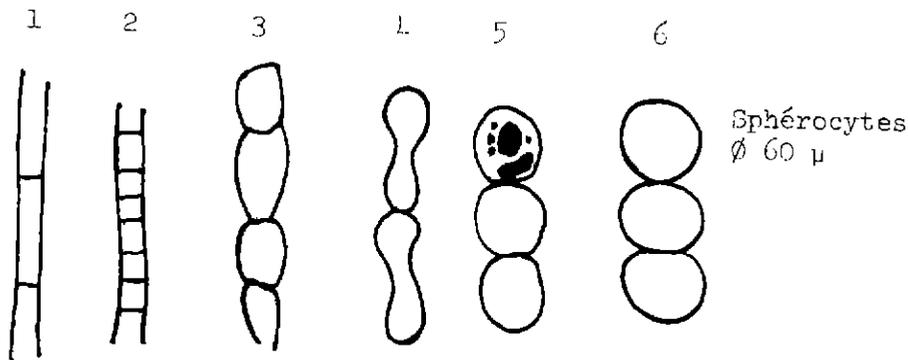


Fig. 3.
Aspects de l'évolution du mycélium (1 et 2) d'*A. flavus*
puis formation des sphérocytes (3, 4, 5, 6).

Chez le cobaye également, où la DL 50 vaut 2 mg par kg on observe rapidement : hépatite et cirrhose pour 0,5 à 1 mg par kg. On observe aussi des effets cancérigènes, il est intéressant de noter que cette dose toxique est très proche de la DL 50.

Au contraire chez le rat la distance entre DL 50 et dose cancérigène est très forte.

Il y a 2 grandes exceptions : le porc, le mouton.

Chez le premier, on observe régulièrement les 3 manifestations (hépatite, cirrhose, cancer).

Pour le mouton, il résiste à ces 3 manifestations.

A une échelle plus fine, au niveau de la cellule, les premières lésions observables sont une redistribution de la structure des nucléoles. Puis on observe des transformations au niveau du cytoplasme.

En ce qui concerne les nucléoles, on constate que la chromatine périphérique émet des prolongements, il y a ségrégation nucléolaire. On voit des fibres d'ARN partout. Il y a aussi des granulations qui proviennent de la transformation des fibres et qui sont les formes de transport de l'ARN synthétisé.

Il n'y a aucune membrane autour du nucléole et il est pourtant extrêmement solide, puisqu'il faut utiliser des ultra-sons pour parvenir à en dissocier quelques particules : il y a une substance fondamentale qui assure la cohésion.

Il suffit de quelques molécules d'aflatoxine pour pouvoir observer ces phénomènes : de 50 à 100 µg. par voie intrapéritonéale chez le rat.

Ceci montre la grande affinité de l'aflatoxine pour des sites bien déterminés qui assurent la cohésion du nucléole.

En ajoutant de l'aflatoxine à de l'ADN *in vitro*, on observe des variations de son spectre qui indiquent une liaison des molécules. Ceci pourrait indiquer comment l'aflatoxine agit sur les sites de chromatine assurant l'homogénéité du nucléole.

9. Actions de l'Aflatoxine sur la cellule hépatique du rat.

Aspects biochimiques

Inhibition des synthèses nucléiques.

L'aflatoxine est un inhibiteur selon la dose à laquelle on l'utilise. Il convient de nuancer les doses en les diminuant pour se rapprocher le plus possible de la limite inférieure des régimes toxiques. Elle agit sur la synthèse des acides nucléiques. On peut noter que l'ARN nucléolaire n'est jamais totalement inhibé. L'inhibition porte sur environ 95 p. 100 d'ARN et d'ADN totaux. Dans les nucléoles isolés on voit une différence entre l'ARN nucléolaire inhibé à 95 p. 100 au bout de 20 minutes et l'ARN non

inhibé qui montre que les synthèses continuent. Parmi ces ARN nucléolaires se sont les molécules les plus longues qui sont le plus inhibées (séparation des diverses moles d'ARN nucléolaires par ultra-centrifugation en gradient de saccharose). A ce sujet on doit noter que la

synthèse habituelle des ARN moyens et courts ne se fait pas dans le nucléole. On résume sur la fig. 4 l'évolution de l'inhibition des synthèses d'ARN et d'ADN pour une dose de 35 μg par kg d'aflatoxine, ce qui correspond à un régime en comprenant moins d'une p.p.m.

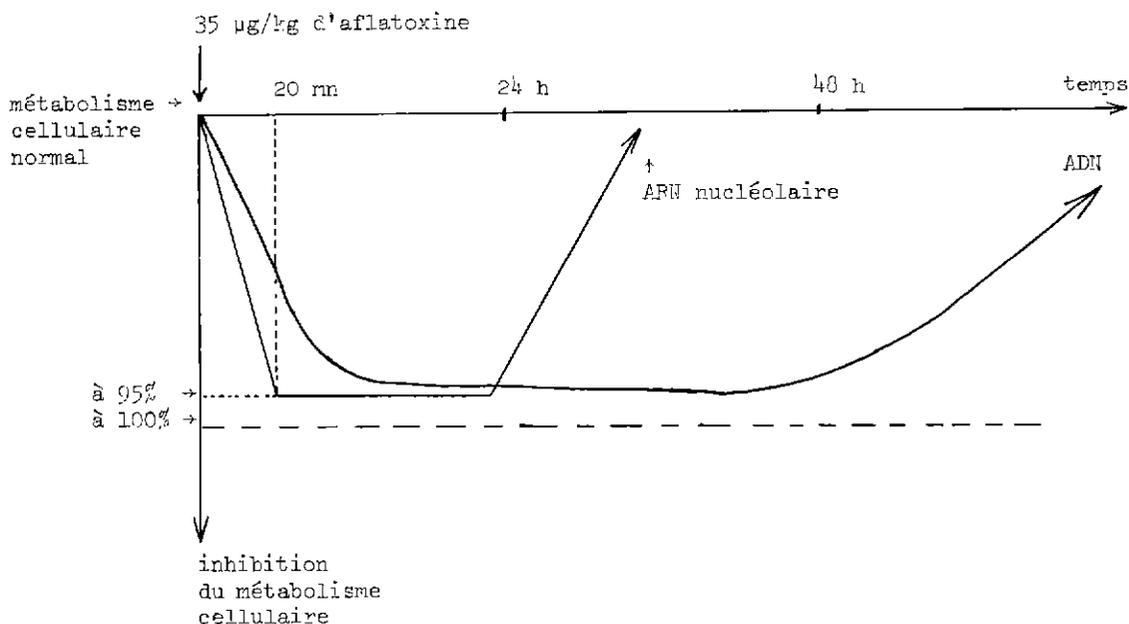


Fig. 4.
Influence de l'aflatoxine sur la synthèse des acides nucléiques.

Pour ce qui est des lésions cancéreuses, plus ou moins liées à l'hérédité, elles concernent plus spécifiquement l'ADN. C'est bien à ce niveau que joue le plus l'aflatoxine, puisque la baisse de taux d'ADN synthétisé intervient tardivement et dure encore au bout de 48 h à 3 jours.

Une courbe de la présence d'aflatoxine dans la cellule (fig. 5) montre que très vite son taux baisse. En corollaire la synthèse d'ADN est arrêtée très longtemps et ceci pour des taux moléculaires très faibles; il y a inhibition pour 1 molécule d'aflatoxine parmi 1.000 ou 10.000 molécules d'ADN. Il y a donc occu-

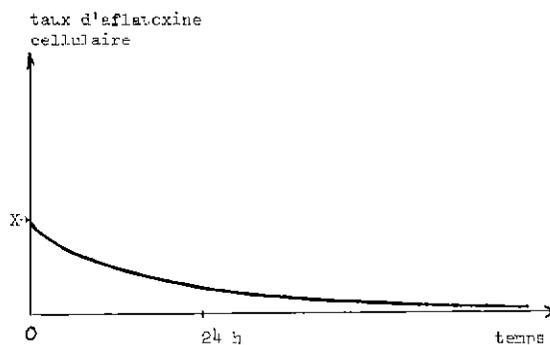


Fig. 5.
Disparition progressive de l'aflatoxine présente dans une cellule au taux X pour $t=0$.

pation de sites précis et limités dans le mécanisme du pouvoir cancérigène de l'aflatoxine (Cancérisation par délétion).

10. Expériences avec l'Aflatoxine B sur les insectes

Il semble que l'aflatoxine soit pathogène pour les insectes.

Les essais ont été faits avec :

- le ver à soie,
- le grillon,
- le hanneton commun.

On administre des extraits méthaloniques et de propylène glycol sous le tégument larvaire ou *per os* à la dose de 400 γ par kg en 1 ou 4 inoculations espacées de 1 à 10 jours.

Aucune toxicité aiguë n'a pu être trouvée dans les 24 h.

On pense, étant donné la présence autour des implants d'extraits, d'enveloppes sereuses qu'il y a empêchement des effets pathologiques. Par ingestion on obtient chez 7/10 des insectes des paralysies en 3 jours. Au bout de 15 jours 10 p. 100 restent vivants, ceci constitue une grande différence par rapport aux animaux témoins qui ont reçu du propylène glycol seul.

On a essayé de badigeonner les feuilles avec des extraits ou d'en ajouter à de la semoule.

On constate un effet répulsif des feuilles badigeonnées, effet qui ne se manifestait pas avec de l'éthanol seul. Il y a une légère diminution de l'alimentation du grillon et quelques décès dont la signification n'a pu être démontrée. On remarque des lésions précoces du tissu adipeux.

IV. NOUVELLES MYCOTOXINES

11. Analyse mycologique systématique d'aliments suspects

Sur des substrats secs et en humidification contrôlée on peut apprécier la xérophylie de nombreux champignons.

Il y a sporulation rapide et croissante dans ces conditions particulières. On peut obtenir une sélection osmotologique.

Les milieux d'isolement comportent un substrat qui est le plus souvent :

- un extrait de NaCl (7 à 8 p. 100).
- un extrait de malt à 5 p. 100 additionné ou non de 2 à 5 p. 100 de saccharose, et
- un extrait de NaCl (7 à 8 p. 100).

Les milieux sont gélosés à 2 p. 100.

Une technique bien rodée permet les isollements à partir de grains ou des produits qui en sont issus.

Un des grands problèmes est la représentativité de l'échantillon prélevé.

12. La toxine B3 d'*Aspergillus flavus*

Classiquement on recherche toujours la B1 qui est parfaitement connue. On avait déjà souligné une dissociation entre la toxicité et la quantité d'aflatoxine B1.

On a même décelé des toxicités sans sa présence. On a pu cristalliser une aflatoxine B3 dans ces cas précis, dont le RF est très bas.

Sur œufs embryonnés elle s'avère beaucoup moins toxique que la B1. Sa DL 50 est proche d'un γ , rappelons que pour la B1, la DL 50 vaut 0,025 γ ; l'aflatoxine B3 est donc 40 à 50 fois moins toxique.