



HAL
open science

Contribution à l'étude des mycotoxines (aflatoxines, ochratoxines, zéaralénone et trichothécènes)

Serge Krivobok

► **To cite this version:**

Serge Krivobok. Contribution à l'étude des mycotoxines (aflatoxines, ochratoxines, zéaralénone et trichothécènes). Sciences pharmaceutiques. 1983. dumas-00745069

HAL Id: dumas-00745069

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-00745069>

Submitted on 24 Oct 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SICD1 de Grenoble : thesebum@ujf-grenoble.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE SCIENTIFIQUE ET MEDICALE DE GRENOBLE

U.E.R. DE PHARMACIE

Domaine de la Merci - LA TRONCHE

1

1^{er} Exemplaire

ANNEE 1983

N° *125X*

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES MYCOTOXINES

(AFLATOXINES, OCHRATOXINES, ZEARALENONE ET TRICHOHECENES)

THESE

présentée à l'UNIVERSITE SCIENTIFIQUE ET MEDICALE DE GRENOBLE
en vue de l'obtention du DIPLOME D'ETAT de

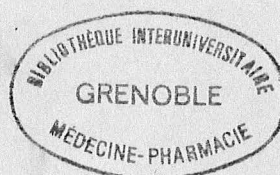
DOCTEUR EN PHARMACIE

par

SERGE KRIVOBOK

soutenue publiquement le 22 DECEMBRE 1983

J U R Y



Mme le Professeur F. SEIGLE-MURANDI Président
M. le Professeur J. LACHARME
M. le Professeur J. FAURE
M. le Professeur D. MARZIN

UNIVERSITE SCIENTIFIQUE ET MEDICALE DE GRENOBLE

U.E.R. DE PHARMACIE

Domaine de la Merci - LA TRONCHE

ANNEE 1983

N°

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES MYCOTOXINES

(AFLATOXINES, OCHRATOXINES, ZEARALENONE ET TRICHOHEGENES)

THESE

présentée à l'UNIVERSITE SCIENTIFIQUE ET MEDICALE DE GRENOBLE
en vue de l'obtention du DIPLOME D'ETAT de

DOCTEUR EN PHARMACIE

par

SERGE KRIVOBOK

soutenue publiquement le 22 DECEMBRE 1983

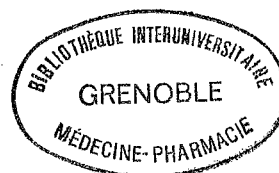
J U R Y

Mme le Professeur F. SEIGLE-MURANDI Président

M. le Professeur J. LACHARME

M. le Professeur J. FAURE

M. le Professeur D. MARZIN



115 007484 1

TABLE DES MATIERES

-:~::~~::~~::~~::~~::~~::~:-

INTRODUCTION	1
<u>CHAPITRE I : SOURCES ET PRESENCE DES MYCOTOXINES DANS L'ENVIRONNEMENT</u>	4
Introduction	4
I. - Les aflatoxines	4
1.1. - Sources	4
1.2. - Présence dans l'environnement	4
1.2.1. - Végétaux et produits d'origine végétale	5
1.2.1.1. - Arachides et denrées à base d'arachide	5
1.2.1.2. - Céréales et denrées à base de céréales	6
1.2.1.3. - Graines oléagineuses et denrées à base de ces graines	7
1.2.1.4. - Graines comestibles (autres que les arachides)	7
1.2.1.5. - Produits divers	7
1.2.1.6. - Aliments pour animaux	8
1.2.2. - Produits d'origine animale	8
1.2.2.1. - Lait liquide, lait en poudre et produits laitiers ...	8
1.2.2.2. - Tissus animaux, oeufs, volaille	9
II. - Les ochratoxines	9
2.1. - Sources	9
2.2. - Présence dans l'environnement	10
2.2.1. - Produits végétaux	10
2.2.2. - Tissus animaux	10
III. - La zéaralénone et les trichothécènes	11
3.1. - La zéaralénone	11
3.1.1. - Sources	11
3.1.2. - Présence dans l'environnement	11
3.2. - Les trichothécènes	12
3.2.1. - Sources	12

3.2.2. - Présence dans l'environnement	12
Conclusion	13
CHAPITRE II : <u>BIOSYNTHESE DES MYCOTOXINES</u>	14
Introduction	14
I. - Les aflatoxines	14
1.1. - Facteurs favorables à la biosynthèse des aflatoxines	14
1.1.1. - Conditions naturelles	14
1.1.2. - Conditions de laboratoire	15
1.1.2.1. - Influence du milieu, de la température, de la lumière, de l'oxygène, des oligo-éléments sur la croissance fon- gique et la production d'aflatoxines	15
1.1.2.2. - Influence d'un milieu compétitif	19
1.1.2.3. - Influence des insecticides et autres molécules	20
1.2. - Biosynthèse des aflatoxines	22
II. - Les ochratoxines	23
2.1. - Facteurs favorables à la biosynthèse des ochratoxines	23
2.2. - Biosynthèse des ochratoxines	24
III. - La zéaralénone	26
3.1. - Facteurs favorables à la biosynthèse de la zéaralénone	26
3.2. - Biosynthèse de la zéaralénone	26
IV - Les trichothécènes	27
4.1. - Facteurs favorables à la biosynthèse des trichothécènes	27
4.2. - Biosynthèse des trichothécènes	27
Conclusion	28
CHAPITRE III : <u>METABOLISME DES MYCOTOXINES</u>	30
Introduction	30
I. - Les aflatoxines	30
1.1. - Absorption	30
1.2. - Distribution tissulaire	30
1.2.1. - Etude chez l'animal	30
1.2.2. - Etude chez l'homme	31
1.3. - Transformation et activation métaboliques	31
1.4. - Excrétion	34
1.4.1. - Etude chez l'animal	34
1.4.2. - Etude chez l'homme	35
II - Les ochratoxines	35

2.1. - Absorption	35
2.2. - Distribution tissulaire et conversion métabolique	35
2.3. - Excrétion	37
III. - La zéaralénone	37
3.1. - Absorption	37
3.2. - Distribution tissulaire et activation métabolique	37
3.3. - Excrétion	39
IV. - Les trichothécènes	39
4.1. - Absorption	39
4.2. - Distribution tissulaire et conversion métabolique	39
4.3. - Excrétion	40
Conclusion	40
CHAPITRE IV : <u>TECHNIQUES DE DOSAGE DES MYCOTOXINES</u>	42
Introduction	42
I. - Propriétés physiques et chimiques des mycotoxines	42
1.1. - Les aflatoxines	42
1.2. - Les ochratoxines	43
1.3. - La zéaralénone	43
1.4. - Les trichothécènes	44
II. - Méthodes de screening des mycotoxines	44
2.1. - Screening des souches toxigènes	44
2.1.1. - Les aflatoxines	44
2.1.2. - Les ochratoxines	45
2.1.3. - La zéaralénone	45
2.1.4. - Les trichothécènes	45
2.2. - Screening de substrats contaminés	46
2.2.1. - Substrats végétaux contaminés par des aflatoxines	46
2.2.2. - Détermination des aflatoxines dans les tissus animaux	46
2.2.3. - Substrats contaminés par des aflatoxines et autres mycotoxines	47
III. - Méthodes de confirmation des mycotoxines	47
3.1. - Les aflatoxines	47
3.1.1. - Méthodes de confirmation basées sur les propriétés chimiques des aflatoxines	48
3.1.2. - Méthodes de confirmation basées sur les propriétés physiques des aflatoxines	48
3.1.3. - Méthodes biologiques de confirmation des aflatoxines	49

3.2. - Les ochratoxines et autres mycotoxines	50
3.2.1. - Les ochratoxines	50
3.2.2. - La zéaralénone	51
3.2.3. - Les trichothécènes	51
IV. - Méthodes de dosage des mycotoxines	51
4.1. - Méthodes de dosage des aflatoxines	52
4.1.1. - Méthodes chimiques	52
4.1.1.1. - La chromatographie en couche mince (TLC)	53
4.1.1.2. - La chromatographie en couche mince bidimensionnelle ..	54
4.1.1.3. - La chromatographie liquide à haute performance (HPLC)	55
4.1.2. - Méthodes biologiques	56
4.2. - Méthodes de dosage des ochratoxines	56
4.2.1. - Méthodes chimiques	56
4.2.1.1. - La chromatographie en couche mince (TLC)	56
4.2.1.2. - La chromatographie liquide à haute performance (HPLC)	57
4.3. - Méthodes de dosage de la zéaralénone	57
4.3.1. - Méthodes chimiques	57
4.3.1.1. - La chromatographie en couche mince (TLC)	58
4.3.1.2. - La chromatographie gaz-liquide (GLC)	58
4.3.1.3. - Dosage par ultra-violet (UV)	58
4.3.1.4. - La chromatographie liquide à haute performance (HPLC)	58
4.4. - Méthodes de dosage des trichothécènes	59
4.4.1. - Méthodes chimiques	59
4.4.1.1. - La chromatographie en couche mince (TLC)	59
4.4.1.2. - La chromatographie gaz-liquide (GLC)	59
Conclusion	60
CHAPITRE V : <u>EFFETS DES MYCOTOXINES CHEZ L'HOMME ET CHEZ L'ANIMAL</u>	61
Introduction	61
I. - Les aflatoxines	61
1.1. - Les effets des aflatoxines chez l'animal	61
1.1.1. - Intoxications naturelles	61
1.1.2. - Etudes expérimentales chez l'animal	62
1.1.2.1. - L'intoxication aiguë	62
1.1.2.2. - L'intoxication chronique	63
1.1.2.2.1. Cancérogénicité	63
1.1.2.2.2. Mutagénicité	64
1.1.2.2.3. Tératogénicité	66

1.1.3. - Effets biochimiques et mode d'action des aflatoxines	66
1.2. - Les effets des aflatoxines chez l'homme	70
1.2.1. - Cancérogénèse hépatique	70
1.2.2. - Syndrome de Reye	71
1.2.3. - Autres hépatopathies	72
1.2.4. - Autres affections	72
II. - Les ochratoxines	73
2.1. - Les effets des ochratoxines chez l'animal	73
2.1.1. - Intoxications naturelles	73
2.1.2. - Etudes expérimentales chez l'animal	73
2.1.2.1. - L'intoxication aigüe	74
2.1.2.2. - L'intoxication chronique	74
2.1.2.2.1. Effets tératogène et embryotoxique de l'ochratoxine A	74
2.1.2.2.2. Mutagénicité et cancérogénicité de l'ochratoxine A	75
2.1.3. - Les effets biochimiques de l'ochratoxine A	75
2.2. - Les effets des ochratoxines chez l'homme	76
III. - La zéaralénone	77
3.1. - Les effets de la zéaralénone chez l'animal	77
3.1.1. - Intoxications naturelles	77
3.1.2. - Etudes expérimentales chez l'animal	77
3.1.3. - Les effets biochimiques de la zéaralénone	77
3.2. - Les effets de la zéaralénone chez l'homme	78
IV. - Les trichothécènes	78
4.1. - Les effets des trichothécènes chez l'animal	78
4.1.1. - Intoxications naturelles	78
4.1.2. - Etudes expérimentales chez l'animal	79
4.1.3. - Effets biochimiques des trichothécènes	80
4.1.4. - Mutagénicité des trichothécènes	81
4.2. - Les effets des trichothécènes chez l'homme	81
Conclusion	82
CONCLUSION	84
BIBLIOGRAPHIE	88

INTRODUCTION

-:~:~:~:~:~:~:~:-

Les civilisations anciennes connaissaient déjà le pouvoir maléfique des champignons. Des renseignements fragmentaires nous sont parvenus sur les intoxications fongiques dans l'Antiquité gréco-romaine (1). Des chroniques religieuses du Moyen-Age font état d'épidémies portant le nom évocateur de feu de Saint Antoine ou mal des ardents ; ceux qui en étaient victimes présentaient : hallucinations et troubles pouvant entraîner la mort. A l'époque, on suspectait déjà une relation entre cette maladie et la consommation de farines moisies, contaminées par l'ergot, forme résistante d'un champignon microscopique *Claviceps purpurea* (2). A partir de la fin du XIXe siècle, les anecdotes concernant des intoxications animales par des moisissures sont plus courantes et précises. C'est le cas, par exemple, de certaines maladies nerveuses constatées chez les chevaux consommant du grain moisi aux Etats-Unis, de 1896 à 1934 (1). Mais il a fallu attendre les années 1960 pour voir le mystère de ces intoxications par les moisissures se dévoiler et, ceci grâce à la découverte d'une substance toxique appelée aflatoxine, sécrétée par certaines souches d'une moisissure commune, *Aspergillus flavus*. A partir de cette époque, de nombreuses toxines produites par les moisissures dans les aliments (mycotoxines), et les troubles qu'elles engendrent (mycotoxicoses) ont été largement étudiés.

En 1960, en Angleterre, des élevages de dindonneaux étaient atteints d'une grave intoxication appelée maladie X des dindons, maladie qui en fit périr des dizaines de milliers. Cette maladie était caractérisée par une dégradation rapide de l'état de santé, des hémorragies sous-cutanées et la mort des volatiles (3). On s'aperçut alors que cette intoxication était provoquée par l'ingestion de tourteaux d'arachides provenant du Brésil. On découvre que ces tourteaux étaient contaminés par une moisissure, *Aspergillus flavus*, et, en 1961, des chercheurs anglais du Tropical Products Institute ont montré que *A. flavus* produisait une substance toxique qu'ils baptisèrent aflatoxine. Par la suite, les recherches ont prouvé qu'il y avait en fait quatre toxines : les aflatoxines B₁, B₂, G₁ et G₂ (4). Ces quatre aflatoxines sont les princi-

pales d'un lot de 17 composés isolés, tous dénommés aflatoxines.

Au cours d'une enquête sur la toxicité de moisissures isolées de céréales et de légumes d'Afrique du Sud, des souches d'*Aspergillus ochraceus* ont été obtenues, souches qui ont causé la mort de canetons, de rats et de souris par administration de ces céréales. L'ochratoxine A, la principale toxine, et les métabolites apparentés ont ultérieurement été isolés à partir d'une des souches d'*Aspergillus ochraceus* (5).

Au Danemark, des chercheurs ont mis en évidence la responsabilité de l'ochratoxine A dans la néphropathie mycotoxique rencontrée chez les porcs et les volailles qui avaient ingéré des aliments contaminés par cette toxine (6). A l'heure actuelle, les 3 ochratoxines connues sont la A, la B et l' α .

En 1928, Mc Nutt et ses collaborateurs ont été les premiers à associer une maladie oestrogénique chez les truies au Wisconsin (qu'ils ont appelé "vulvovaginite", se caractérisant par un prolapsus vaginal avec hypertrophie considérable de la vulve) suite à la consommation de maïs moisi et sont parvenus à reproduire ce syndrome oestrogénique (7). De semblables affections ont été constatées quelques années plus tard dans d'autres régions des Etats-Unis et d'autres pays (1). Plusieurs moisissures du genre *Fusarium* ont été mises en évidence à partir d'aliments moisiss ayant des effets oestrogéniques. En 1955, Christensen et al. ont isolé d'un *Fusarium sp.* un composé qu'ils ont appelé F-2 ou zéaralénone. Plusieurs substances chimiquement proches ont été caractérisées (F-3, F-4, F-5) mais F-2 a la plus forte activité oestrogénique.

En dehors de ces mycotoxines, d'autres ont été depuis lors découvertes et identifiées. Ce sont, en particulier, les trichothécènes dont les premiers ont été découverts lors d'une recherche d'antibiotiques en 1946 (8) et la patuline isolée pour la première fois sous forme cristalline en 1942 à partir d'une souche de *Penicillium claviforme* (9).

Ces dernières décennies ont vu l'identification et l'isolement de substances toxiques appelées "^{mycotoxines}mycotoxico^{toxicoses}ses" sécrétées par diverses espèces de Micromycètes, responsables de ~~toxines~~ chez les animaux mais aussi suspectées dans certaines affections humaines. Les mycotoxines les plus importantes sont les aflatoxines, les ochratoxines, la zéaralénone et les trichothécènes (3). Ce travail bibliographique regroupe les principaux résultats obtenus lors de recherches concernant les sources et la présence dans l'environnement de ces mycotoxines, leur biosynthèse, leur métabolisme chez l'animal, leurs effets toxiques chez l'animal et chez l'homme et les principales méthodes

d'analyses et de dosages de ces toxines fongiques dans les denrées contaminées.

Il servira de base à un travail de recherche sur l'identification et le dosage des aflatoxines, ainsi que sur les facteurs physiologiques influençant la production fongique d'aflatoxines.

CHAPITRE I

-:-:-:-:-

SOURCES ET PRESENCE DES MYCOTOXINES DANS L'ENVIRONNEMENT

INTRODUCTION

La liste des moisissures aptes à produire des toxines responsables des mycotoxicoses est impressionnante et ne cesse de s'allonger. De nombreux facteurs, tels que les facteurs écologiques, influencent considérablement la synthèse des mycotoxines (ces facteurs seront étudiés au chapitre II). De plus certaines moisissures élaborent des toxines seulement dans des conditions artificielles. L'exemple typique est la PR toxine produite en milieu synthétique par la moisissure *Penicillium roqueforti*, moisissure utilisée normalement pour la préparation des fromages bleus à pâte persillée (10). En ce qui concerne les aflatoxines, quelques données bibliographiques signalent que certains *Aspergillus* (*A. wenti*, *A. niger*, *A. ochraceus*), des *Penicillium* (*P. puberulum*, *P. frequentans*) et des *Rhizopus* produiraient *in vitro* une ou plusieurs de ces mycotoxines (11). De ce fait, nous nous limiterons à l'étude des principales moisissures susceptibles d'élaborer des toxines dans des conditions naturelles.

I - LES AFLATOXINES1.1. - Sources

Les aflatoxines sont produites par certaines souches d'*Aspergillus flavus* et d'*Aspergillus parasiticus* (3, 12).

1.2. - Présence dans l'environnement

Depuis leur découverte en 1961, les aflatoxines ont été abondamment recherchées dans de nombreuses denrées alimentaires (3). Nous allons nous limiter à leur présence naturelle dans les aliments. En effet, des résidus d'aflatoxines ont été détectés dans des tissus animaux, des oeufs et de la

volaille après alimentation expérimentale des animaux avec des produits contaminés d'aflatoxines. Toutefois, jusqu'à présent, aucune aflatoxine n'a encore été trouvée dans de tels produits commercialisés (13). Des quatre principales aflatoxines (B_1 , B_2 , G_1 , G_2), l'aflatoxine B_1 est celle dont la teneur est généralement la plus élevée (3).

1.2.1. - Végétaux et produits d'origine végétale

Des aflatoxines ont été décelées dans toute une variété de denrées alimentaires, mais la contamination la plus importante a été observée dans des cacahuètes et autre graines oléagineuses, y compris les graines de cotonnier et de maïs. Les noix ou amandes les plus fréquemment contaminées sont les noix du Brésil et les pistaches (3).

1.2.1.1. - Arachides et denrées à base d'arachide

Arachides et denrées à base d'arachide	Pays	Nb. échant.	Conc. en aflatoxines ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Rf.
Stock de cacahuètes	Etats-Unis	78	0 - 91 2 échant. > 50	14
Cacahuètes torréfiées	Etats-Unis	361	15 % positifs, traces - 50	15
Beurre de cacahuète	Etats-Unis	141	4 échant. > 20 25 % échant. < 1	16
Graines d'arachide	Etats-Unis	220	20 échant. > 20 10 % échant. < 1	16
Gâteaux d'arachide	Nigéria (1962 à 1967)	895	36 % échant. < 50 50 < 50 % échant. < 250 250 < 14 % échant. < 1000 1 échant. > 1000	17
Arachides	Soudan (1969 à 1970)	173	41 % échant. positifs 17 % échant. < 50 50 < 7 % échant. < 250 250 < 9 % échant. < 1000 8 % échant. > 1000	18
Arachides vendues pour la consommation humaine	Ouganda		15 % échant. > 1000 2,5 % échant. > 10 000	19
Arachides	Thaïlande	216	49 % échant. contaminés Conc. moyenne en aflatoxine B_1 / 216 échant. = 426 Conc. moyenne des 4 aflatoxines (B_1 , B_2 , G_1 , G_2) / 216 échant. = 750 Conc. moyenne en aflatoxine B_1 des échant. contaminés = 1530 Conc. maximale des 4 aflatoxines = 12 256	20
Gâteau d'arachide	Inde (1970 à 1973)		330 - 996	21

1.2.1.2. - Céréales et denrées à base de céréales

Céréales et denrées à base de céréales	Pays	Conc. en aflatoxines (µg/kg)	% échant. positifs/Nb total	RÉ.
Maïs	Etats-Unis (Caroline du Nord)	Maximum 3622ppb	78,6 % positifs dont 58,4 % > 20 ppb	22
Maïs blanc	Etats-Unis	6 - 141	36,3 % positifs	23
Maïs jaune	Etats-Unis	4 - 308	34,6 % positifs	23
Maïs	Etats-Unis	6 - 25	2,4 % positifs	24
Maïs	Etats-Unis	80 - 8 733	Echant. associées avec la mort de porcs	25
Maïs	Etats-Unis	80 - 8 733	Echant. associées avec une aflatoxicose chez des poules pondeuses	26
Maïs	Etats-Unis	83 000-101 000	Echant. associées avec une aflatoxicose chez des poulets	27
Maïs	France	0,25 - 187	26 % positifs	28
Maïs blanc	Nigéria	100 - 1 000	100 % positifs	29
Maïs jaune	Nigéria	100 - 1 000	100 % positifs	29
Maïs	Sénégal	80 - 400	14,3 % positifs	30
Maïs	Mozambique	< 1 000	3,8 % positifs	31
Maïs	Ouganda	100 - 1 000	44,9 % positifs	32
Maïs	Inde	6 250 - 15 600	Echant. pris dans un secteur où un nb large de personnes sont décédées	33
Maïs	Australie	320 000	Echant. associées avec une aflatoxicose chez les cochons	34
Blé	France	0,25 - 180	47 % positifs	28
Farine de blé	France	0,25 - 150	28 % positifs	28
Spaghetti	Canada	13	Echant. isolé	35
Sorgho	Etats-Unis	3 - 19	1,2 % (non confirmé)	36
Sorgho	Etats-Unis	3 - 5		37
Sorgho	Etats-Unis	20		38
Sorgho	Ouganda	1 - 1 000	37,7 % positifs	32
Sorgho	Ethiopie	78 (total des aflatoxines)	Echant. isolé	39
Sorgho	Australie	8 000		34
Sorgho	France	0,25 - 100	25 % positifs	28
Avoine	Etats-Unis	6	< 1 % positifs (non confirmé)	36
Avoine	France	0,25 - 100	42 % positifs	28
Avoine	République d'Irlande	5	39 échant.	40
Orge	Japon	10	1 échant. positif	41
Orge	France	0,25 - 10	7 % positifs	28
Millier	Thaïlande	248		20
Millier	Ouganda	1 - 100	16,4 %	32
Farine de seigle	Allemagne	< 100		42
Seigle	France	0,25 - 100	19 % positifs	28
Breakfast à base de céréales	Etats-Unis	< 20 B ₁	8 échant. (aussi 50 µg/kg G ₁)	43
Riz	Philippines	16		44
Riz	Vietnam du Sud	Non déterminé		45
Riz	Thaïlande	98 (total des aflatoxines)		20
Riz	Mozambique	< 1 000		31
Riz	Sénégal	0,03 - 2 000	53 % positifs	30
Gâteau de riz	Japon	10		41
Riz abimé	Brazil	400		21
Son de riz	Philippines	50	Moyenne de 8 échant.	21

1.2.1.3. - Graines oléagineuses et denrées à base de ces graines

Graines oléagineuses et denrées à bases de ces graines	Pays	Nb Echant.	Conc. en aflatoxines (µg/kg)	% échant. positifs/Nb total	Rf.
Graines de cotonnier	Etats-Unis	2780		15 % positifs	46
Graines de cotonnier	Amérique Centrale	90	30 - 60 (afl. B ₁)	4 échant. positifs (4,4 %)	47
Graines de cotonnier	Etats-Unis	Plus de 3000		6,5 - 8,8 %	15
Farine de graines de cotonnier	Etats-Unis	Plus de 3000		12,8 - 21,5 %	15
Graines de soja	Maryland	26	4 - 81	46 %	48
Gâteau de soja	France	51	10 - 100 > 100	15 échant. contaminés dont 8 7	28
Coprah et farine de coprah		72	Traces - 30	88 %	15

La présence d'aflatoxines a été aussi décelée dans des gâteaux à base de Sésame, de la farine de Carthame provenant d'Inde, de la farine de tournesol provenant d'Australie et de la farine de graines de palmier importée en Europe (21). De même, des productions de coprah et de noix de coco ont été trouvées contaminées par des aflatoxines dans différentes régions du monde (21, 28, 49, 50).

1.2.1.4. - Graines comestibles (autres que les arachides)

Graines comestibles	Pays	Nb échant.	% échant. positifs/Nb total	Rf.
Noix du Brésil	Norvège		66 % contaminées par l'aflatoxine B ₁	51
Noix du Brésil	en voie d'exportation pour la Suède	23 lots	100 %	52
Amandes	Californie	74	10 échant. contaminés (13,5 %) dont 9 à un taux < 20 µg/kg	53

Des aflatoxines ont été trouvées, aussi, dans des noisettes (54), des pistaches (55) (dans la plupart des cas, les taux en aflatoxines étant relativement bas), des noix communes, des pécans et des avelines (3).

1.2.1.5. - Produits divers

Des aflatoxines ont été aussi détectées dans des haricots en Thaïlande (56), en Afrique (32) et aussi dans des épices et condiments

(poivre de Cayenne et poudre de piment indien) (57), mais à des taux relativement bas.

1.2.1.6. - Aliments pour animaux

Aliments	Pays	Nb échant.	Résultats	Rf.
Aliments pour animaux (à base de farines d'arachides)	Pologne	306	12,7 % d'échant. contaminés : taux > 100 µg/kg dans 4,2 % des cas taux > 1000 µg/kg dans 2,6 % des cas	58
Aliments pour porcs	Pologne		11,4 % d'échant. contaminés dont 6 échant. (5,7 %) ont un taux > 250 µg/kg en aflatoxines	58
Aliments pour animaux	R.F.A.		1/60 échant. à un taux > 20 µg/kg 45/105 échant. à un taux 7 - 300 µg/kg	59 60
Aliments pour bovins	Royaume Uni	172	95 échant. contaminés par l'aflatoxine B ₁ à des taux de 1 à 350 µg/kg et où 92,4 % d'entre eux n'en contenaient pas plus de 30 µg/kg	3

1.2.2. - Produits d'origine animale

1.2.2.1. - Lait liquide, lait en poudre et produits laitiers

Des enquêtes menées dans plusieurs pays ont montré que l'aflatoxine M₁ (toxine provenant de la métabolisation de l'aflatoxine B₁) peut contaminer le lait liquide ou en poudre et les produits laitiers. Les résultats de quelques enquêtes ont été mis sous forme de tableau (3).

Résultats de quelques enquêtes sur la teneur en aflatoxine M₁ du lait de vache.

Echant. de lait	Pays	Nb total d'échant. analysés	Nb d'échant. contenant de l'aflatoxine M ₁	Intervalle des conc. relevées (µg/l ou kg)	Rf.
Liquide	R.F.A.	61	28	0,01 - 0,25	61
	R.F.A.	419	79	Traces - 0,54	62
	R.F.A.	260	118a	0,05 - 0,33	63
	Belgique	68	42	0,02 - 0,2	64
	Inde	21	3	0 - 13,3	65
	Pays-Bas	95	74	0,09 - 0,5	66
	R.D.A.	36	4a	1,7 - 6,5 c	67
	Royaume Uni	278	85a	0,03 - 0,52	68
En poudre	Afrique de Sud	56	0	-	69
	R.F.A.	18	0f	-	67
	R.F.A.	166	8	0,67 - 2,0	70
	R.F.A.	52	35	Traces - 4,0	71
	R.F.A.	120	7a	0,05 - 0,13	72
	Etats-Unis	320	24	0,1 - 0,4	73
	Etats-Unis	302	192	Traces - 3,9 e	73

- a - Effet saisonnier, c'est-à-dire concentrations évidemment subordonnées au taux de contamination de la nourriture.
- b - Echantillons prélevés chez les détaillants dans 4 états du Sud-Est des Etats-Unis ; on a estimé que dans ces régions la teneur en aflatoxines des 2/3 environ des récoltes était $> 20 \mu\text{g}/\text{kg}$ par suite d'une sécheresse exceptionnelle, d'une atteinte par des insectes et des températures élevées de 1977.
- c - Valeurs correspondant à 4 échantillons recueillis en hiver ; les 31 autres échantillons hivernaux étaient exempts d'aflatoxine, ainsi que 12 échantillons de lait estivaux (seuil de détection : $0,1 \mu\text{g}/\text{kg}$).
- d - La teneur en aflatoxine M_1 de 92,5 % des échantillons était $< 0,1 \mu\text{g}/\text{litre}$.
- e - Taux $0,1 - 0,4 \mu\text{g}/\text{kg}$ dans 158 échantillons ; $> 0,5 \mu\text{g}/\text{kg}$ dans 19 échantillons.
- f - Contamination par l'aflatoxine B_1 décelée dans l'échantillon.

Des taux faibles en aflatoxine M_1 ont été décelés dans certains fromages (74, 75).

1.2.2.2. - Tissus animaux, oeufs, volaille

Rodricks et Stoloff (13) ont détecté des résidus d'aflatoxines dans des tissus animaux, des oeufs et de la volaille après alimentation expérimentale des animaux avec des produits contaminés d'aflatoxines ; cependant, jusqu'à présent, aucune aflatoxine n'a encore été trouvée dans de tels produits commercialisés.

II - LES OCHRATOXINES

2.1. - Sources

Les ochratoxines sont produites par plusieurs espèces de champignons des genres *Aspergillus* et *Penicillium* (76). Ce sont :

<i>Aspergillus</i>	<i>Penicillium</i>
<i>A. ochraceus</i>	<i>P. viridicatum</i>
<i>A. sulphureus</i>	<i>P. palitans</i>
<i>A. melleus</i>	<i>P. commune</i>
<i>A. sclerotiorum</i>	<i>P. variable</i>
<i>A. alliaceus</i>	<i>P. purpurescens</i>
<i>A. ostianus</i>	<i>P. cyclopium</i>
<i>A. petrakii</i>	<i>P. verrucosum</i>
	<i>P. chrysogenum</i>

2.2. - Présence dans l'environnement

2.2.1. - Produits végétaux

Le tableau suivant (3) résume les résultats de multiples enquêtes sur les produits végétaux menés dans diverses parties du monde.

Produits	Pays	Nb d'échant. analysés	Proportion d'échant. contaminés (%)	Intervalle du degré de contamination (µg/kg)	Rf.
Blé, avoine, seigle, orge (pour l'alimentation des animaux)	Canada	32	56,3	30 - 27000 c	77
Orge, avoine	Danemark	33	57,6	28 - 27500 b,c	78
Orge à malt	Danemark	50	6,0	9 - 189	79
Maïs	France	463	2,6	15 - 200	80
Orge, blé, avoine, seigle, maïs (pour les animaux)	Pologne	150	5,3	50 - 200	81
Mélange alimentaire pour les animaux	Pologne	203	4,9	10 - 50	82
Orge, avoine (pour les animaux)	Suède	84	8,3	16 - 409	83
Maïs, blé, orge	Yougoslavie	47	12,8	5 - 90	84
Orge	Etats-Unis	127	14,2	10 - 40	85
Grains de café	Etats-Unis	267	7,1	20 - 360	86
Maïs	Etats-Unis	283	0,4	110 - 150	87
Maïs	Etats-Unis	293	1,0	83 - 166 a	24
Blé ("red winter")	Etats-Unis	291	1,0	5 - 115	88
Blé ("red spring")	Etats-Unis	286	2,8	5 - 115	88

a - Deux de ces échantillons contenaient aussi de l'ochratoxine B.

b - Deux autres échantillons d'orge contenaient en outre de l'ochratoxine B.

c - La plupart des échantillons très contaminés avaient été "surchauffés".

2.2.2. - Tissus animaux

Des résidus d'ochratoxine A furent décelés dans des tissus de porcs dont certains étaient atteints par la néphropathie porcine. Cette présence d'ochratoxine A étaient due à l'ingestion d'aliments contaminés par cette mycotoxine.

En 1971 (89), suite à des prélèvements à l'abattoir, de tissus sur des porcs ayant consommé des aliments contaminés, des résidus d'ochratoxine A furent trouvés dans :

- 18/19 reins à des taux n'excédant pas 67 µg/kg
- 7/8 foies
- tous les échantillons adipeux.

Au Danemark, une enquête sur les reins de porcs touchés par la néphropathie porcine, a montré que 35 % des reins malades contenaient des résidus d'ochra-

toxine A à des taux de 2 à 68 µg/kg (90). En Suède, une enquête analogue révélait que 25 % des reins atteints contenaient de l'ochratoxine A à des taux de 2 à 104 µg/kg (91). De plus, des concentrations d'ochratoxine A atteignant parfois 29 µg/kg ont été trouvées dans des échantillons de tissus musculaires de poules et de poulets prélevés dans un abattoir. Il s'agissait de volailles condamnées par néphropathie (92). Par contre, aucun résidu d'ochratoxine n'a été décelé dans les oeufs (3).

III - LA ZEARALENONE ET LES TRICHOHECENES

3.1. - La zéaralénone

3.1.1. - Sources

La zéaralénone est produite par des souches de *Fusarium graminearum*, *F. tricinctum*, *F. oxysporum*, *F. moniliiforme*, *F. roseum*, *F. sporotrichoides*, *F. culmorum*, *F. avenaceum*, *F. nivale* et *F. sambucinum* (93).

3.1.2. - Présence dans l'environnement

La zéaralénone a été trouvée à l'état de contaminant naturel, en particulier dans le maïs et occasionnellement dans d'autres céréales (orge) et dans des aliments pour animaux (3). Le tableau suivant résume les recherches faites à ce sujet.

Produits	Pays	Nb d'échant.	Conc. en zéaralénone	% échant. positifs/ Nb total	Rf.
Maïs	Etats-Unis	576	450 - 800 µg/kg	1 % (6 échant. positifs)	24
Maïs	Etats-Unis	223	0,1 à 5,0 mg/kg a	17 % (38 échant. positifs)	94
Maïs, orge	France				15
Mélanges alimentaires pour animaux	Angleterre Finlande Yougoslavie				15
Farine de maïs	Etats-Unis	11	12 - 69 µg/kg	82 % (9 échant. positifs)	95
Floccons de maïs			13 µg/kg	Echant. isolé	98
Bière de maïs	Zambie		0,01 - 4,6 mg/l		96
Boissons sucrées, porridges aigrés, bières	Swaziland	55	8 - 53 mg/kg b	11 % (6 échant. positifs)	97
Bière	Lesotho	140	0,3 - 2 mg/kg b	12 % (17 échant. positifs)	97
Noix du commerce	France	60	50 µg/kg 105 µg/kg 450 µg/kg	5 % (3 échant. positifs)	99

- a - Les conditions étaient favorables à la rouille des épis par *Fusarium*.
 b - De tels taux en zéaralénone n'ont été signalés nulle part ailleurs.
 Par contre, aucune présence de zéaralénone n'a été décelée dans des tissus d'animaux.

3.2. - Les Trichothécènes

3.2.1. - Sources

Un ou plusieurs des trichothécènes ont été isolées de souches des espèces de *Fusarium* suivantes : *F. episphae*, *F. lateritium*, *F. nivale*, *F. oxysporum*, *F. rigidisculum*, *F. solani*, *F. roseum* et *F. tricinctum*. En outre, des espèces de *Cephalosporium*, *Myrothecium*, *Trichoderma* et *Stachybotrys* se sont révélées productrices de trichothécènes (3).

3.2.2. - Présence dans l'environnement

Plus de 30 dérivés trichothécéniques ont été isolés dans des cultures fongiques mais, jusqu'à présent, seuls 4 d'entre eux ont été identifiés à l'état de contaminants naturels dans des denrées alimentaires et de plus occasionnellement. Ces quatre dérivés sont : la toxine T-2, le nivalénoïl, le désoxynivalénoïl (vomitoxine) et le diacétoxyscirpénoïl. Le tableau suivant donne les différentes denrées dans lesquelles furent décelées ces 4 toxines (3).

Composés	Conc. ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Denrées	Rf.
Toxine T-2	2	Maïs	100
Toxine T-2	25	Orge	101
Toxine T-2	0,076	Mélange alimentaire pour animaux	102
Nivalénoïl	Non indiquée	Orge	103
Désoxynivalénoïl	7,3	Orge	103
Désoxynivalénoïl	non mesurée	Maïs	104
Désoxynivalénoïl	0,1 - 1,0 - 1,8	Maïs (3 échant.)	102
Désoxynivalénoïl	1,0 - 1,0 - 0,06	Mélange alimentaire pour animaux (3 échant.)	102
Diacétoxyscirpénoïl	0,38 - 0,5	Mélange alimentaire pour animaux (2 échant.)	102

Aucune de ces toxines n'a été trouvée dans des denrées d'origine animale.

CONCLUSION

Les mycotoxines, élaborées par diverses souches fongiques ont été détectées en tant que contaminants naturels, dans diverses denrées alimentaires d'origine végétale, et même d'origine animale en ce qui concerne les aflatoxines et les ochratoxines. On est en droit de se demander quelle est la cause de la synthèse de ces mycotoxines par certaines souches fongiques ? Et aussi quels sont les facteurs dominants agissant sur cette biosynthèse ?

CHAPITRE II

-:-:-:-:-

BIOSYNTHESE DES MYCOTOXINES

INTRODUCTION

Le développement de techniques précises de l'analyse (molécules marquées au ^{14}C et au ^{13}C) ainsi que l'utilisation de mutants bloqués d'espèces fongiques et de systèmes de cellules libres, ont permis de faire avancer la compréhension de la biosynthèse des mycotoxines par les espèces fongiques concernées. Les grandes étapes de la biosynthèse des aflatoxines, ochratoxines, zéaralénone et trichothécènes ont été élucidées. Les conditions naturelles favorables à la production des mycotoxines ont été établies et les recherches se poursuivent en laboratoire sur divers facteurs pouvant influencer cette production.

I - LES AFLATOXINES1.1. - Facteurs favorables à la biosynthèse des aflatoxines1.1.1. - Conditions naturelles
.....

De vastes études menées dans des conditions strictement contrôlées ont établi que, pour la croissance d'*Aspergillus flavus* et la production d'aflatoxines, la limite inférieure de l'humidité du substrat est celle de l'équilibre avec une humidité relative de 85 % (c'est-à-dire une activité aqueuse (a_w) de 0,85) (105, 106). Les températures minimale, optimale et maximale pour la production d'aflatoxines sont respectivement de 12°, 27° et 40-42°C (106).


Ayant étudié l'influence de l'activité aqueuse et de la température sur la croissance de *A. flavus* et de *A. parasiticus* et sur leur production d'aflatoxines, Northolt et al. (107, 108) ont conclu qu'au-dessous d'une activité aqueuse de 0,83 et d'une température de 10°C, il ne se formait pas d'aflatoxines B_1 en quantité décelable.


La figure 1 montre les conditions maximales et minimales de a_w et de température pour la croissance de *A. flavus* et de *A. parasiticus* et la production d'aflatoxines. D'après ces résultats, l'aflatoxine B₁ peut être produite à des conditions de a_w et de température qui sont proches du minimum de a_w et de température pour la croissance fongique.

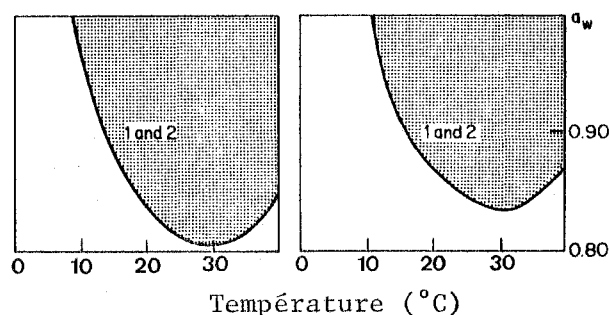
Fig. 1 : L'influence de l'activité aqueuse (a_w) et de la température sur la croissance et la formation d'aflatoxines pour *A. flavus* et *A. parasiticus* (107).

Espèces fongiques

1. *Aspergillus flavus*
2. *Aspergillus parasiticus*

Croissance fongique 

Production d'aflatoxines 



1.1.2. - Conditions de laboratoire

De nombreux travaux ont été entrepris sur l'influence de divers facteurs (par exemple, le milieu, la température, les oligo-éléments, les insecticides) sur la croissance fongique et la production d'aflatoxines. Ces travaux sont très importants, car ils permettent de connaître les conditions favorables ou non à la production des aflatoxines, dans un but pratique qui est de limiter au maximum les risques de contamination fongique et de production d'aflatoxines dans certaines denrées alimentaires.

1.1.2.1. - Influence du milieu, de la température, de la lumière, de l'oxygène, des oligo-éléments sur la croissance fongique et la production d'aflatoxines.

Les résultats des expériences faisant intervenir ces divers facteurs sur la production d'aflatoxines sont donnés dans le tableau suivant :

Facteurs	Croissance fongique	Production d'aflatoxines	Rf.
Sources de carbone : Ribose, Xylose, Glucose, Fructose, Sorbose, Mannose, Galactose, Maltose, Sucrose, Raffinose, Glycérol		Induction de la production	109
Milieu Czapeck : addition de saccharose, glucose, galactose		Effet favorable sur la production	110

En milieu de base contenant du sulfate d'ammonium comme source d'azote, pH optimum = 4,5 ; source de carbone : fructose, maltose		La production d'aflatoxines est plus élevée pour le maltose que pour la fructose	111
Milieu Czapeck : additions de certains acides aminés (méthionine - glutamine) ou d'acides organiques (acide malique - acide glutamique)		Effet favorable sur la production	110
Lactose, acide lactique, pyruvate de sodium, acide oléique, acide citrique, acétate de sodium, α -méthyl-D-glucoside, 3-O-méthyl-D-glucoside, cAMP, cGMP		Pas d'induction de la production d'aflatoxines	109
Milieu Czapeck : addition d'huiles (arachide, ricin, olive, lin) addition d'acides lauriques, myristique, palmitique, arachidique, béhénique, lignocérique		Pas d'induction de la production	110
Milieu : poudre de riz (5 % p/v) + "corn steep" (4 % p/v). pH initial = 4. Température = 25°C. Incubation de 6 jours.		Production maximale d'aflatoxines obtenue par <i>A. flavus</i> (2575 μ g/ml)	112
pH = 3 ou pH = 11, température d'incubation < 20°C ou \geq 40°C	Inhibition	Inhibition de la production	112
Souches d' <i>A. flavus</i> et d' <i>A. parasiticus</i> : température \leq 7,5°C ou \geq 40°C		Pas de production	113
Souches d' <i>A. flavus</i> et d' <i>A. parasiticus</i> : température : 22°C	Croissance	Production d'aflatoxines	113
<i>A. flavus</i> en culture stationnaire dans l'obscurité à 30°C		Taux maximum d'aflatoxine B ₂ après le 8ème jour d'incubation	111
<i>Aspergillus flavus</i> pH = 5 pH = 7 pH = 9 t°C = 20°C t°C = 30°C t°C = 40°C 30 % d'humidité relative, pH = 5, t°C = 20°C 63 % d'humidité relative, pH = 9, t°C = 40°C		Production maximale (pH opti.) Production relativement élevée Diminution significative Production maximale (t°C optim.) Production relativement élevée Production très basse Production la plus élevée (5,093 ppm) Production la plus faible (2,197 ppm)	115
<i>Aspergillus parasiticus</i> sur du pain complet		Aucune production	116
<i>Aspergillus parasiticus</i> : 30°C + lumière continue		Aucune production	117
<i>Aspergillus parasiticus</i> : 15°C + lumière continue 15°C + obscurité 35 ou 40°C + lumière continue 35 ou 40°C + obscurité 20 ou 25°C + lumière continue 20 ou 25°C + obscurité 30°C + lumière continue 30°C + obscurité	Aucune Faible Bonne Bonne Moyenne Moyenne Bonne Bonne	Aucune production Aucune production Aucune production Aucune production Production + élevée qu'à l'obsc. Production d'aflatoxines Production élevée (522 μ g/50 ml) Production optimale observée (625 μ g/50 ml)	118

Très basse tension d'oxygène Traces d'air + vitamines B Traces d'air + extraits de levures	Croissance	Production d'aflatoxines Augmentation de la production Augmentation plus rapide par rapport à celle avec vitamine B	119
Milieu sans vitamine B + flux d'azote		Production basse mais encore considérable	
Pas de courant gazeux dans le milieu Acide formique neutralisé avec de l'ammoniaque	Croissance	Pas de production Augmentation de la production	
Acide formique non neutralisé	Croissance très lente	Faible formation d'aflatoxines	
Milieu sans flux gazeux + enrichissement en CO ₂ + Vitamines B		Pas de production	
Milieu sans flux gazeux + enrichissement en CO ₂ + Vitamine B + Acide formique		Production de petites quantités d'aflatoxines	
Même milieu que précédemment + arrivée d'un flux gazeux		Augmentation de la production	
<i>Aspergillus flavus</i> : milieu sucrose-nitrate - sels			120
Addition de zinc (5 µg/g), fer (2 µg/g) et magnésium (100 µg/g)		Production normale	
Si on ajoute du magnésium (1 µg/g)		Interférence faible sur la production	
Milieu + zinc		Exigence du zinc pour une production maximale	121
Milieu + zinc + fer		Pas d'augmentation constatée	121
Milieu synthétique ; glucose, ammoniac, sels			122,123
Suppression de zinc (2 µg/g) du milieu		Réduction de la production	
<i>A. flavus</i> + milieu de germes de maïs : 5 à 10 µg de manganèse, de cuivre, de cadmium ou de chrome/g de germes.		Augmentation de la production	124
Addition de plomb ou de zinc (50 à 250 µg/g)		Augmentation de la production	
Addition de 25 µg de cadmium ou de 500 µg de cuivre/g de germes		Diminution de la production	
Baryum (1 ppm)	Pas d'effet sur la croissance	Inhibition complète de la production	125

D'après tous les résultats énoncés dans ce tableau, plusieurs conclusions peuvent être établies :

— Influence de la composition du milieu où se développe la moisissure sur la production d'aflatoxines : certains sucres sont plus favorables que d'autres (glucose, saccharose, maltose) ainsi que certains acides aminés ou organiques. Par contre, aucune toxinogénèse n'a été trouvée avec différentes huiles et des acides gras saturés. Les vitamines B augmentent la production d'aflatoxines, même dans des conditions défavorables (basse tension d'oxygène). Des extraits de levure ou de pomme de terre contenant des vitamines B augmentent plus rapidement la production d'aflatoxines que les solutions pures de vitamines B.

D'après les résultats obtenus (119), l'acide formique est un facteur très important. En effet, l'acide formique neutralisé par l'ammoniaque (s'il ne l'est pas, le pH du milieu tombe à 1, ce qui est défavorable à la produc-

tion d'aflatoxines) augmente la croissance fongique et la production de toxines. De plus, il a été observé la production de faibles quantités d'aflatoxines lorsqu'il est introduit dans un milieu non compatible avec la production de toxines (milieu à atmosphère enrichi en CO_2 avec absence de flux gazeux). Ceci laisse donc supposer un rôle primordial de l'acide formique au niveau de la production d'aflatoxines. L'influence des oligoéléments sur la production des aflatoxines est importante et l'exigence du zinc pour une production maximale de toxines est bien établie.

— Influence du pH du substrat : à ce sujet, les rapports se rejoignent, donnant un pH optimum pour la production d'aflatoxines voisin de 4 - 5.

— Influence de la température et de l'humidité relative : il semble que la température optimale soit comprise entre 20 et 30°C pour les souches d'*A. flavus* et d'*A. parasiticus* utilisées. Une humidité relative voisine de 30 % favorise grandement la production d'aflatoxines mais le manque de rapports à ce sujet ne permet pas de confirmer ce résultat.

Il est à noter deux rapports de travaux sur l'influence de cycles de température sur la production d'aflatoxines B_1 et G_1 par *Aspergillus parasiticus* (126, 127). Shroeder et Hein (126) rapportèrent que la température variant de 20 à 40-50°C diminuait la production d'aflatoxines mais augmentait la production d'aflatoxine B_1 par rapport à G_1 . Par contre, la température variant de 26,6°C à 10-20°C n'affectait pas la production d'aflatoxines, la production d'aflatoxine B_1 par rapport à G_1 restant la même. Récemment, Lin et al. (127) ont repris ces travaux et les résultats sont les suivants :

- les cultures soumises à une température variant de 33 à 25°C augmentent leur production d'aflatoxine B_1 en comparaison avec les cultures mises à une température constante de 25°C, et augmentent aussi leur production d'aflatoxine G_1 en comparaison avec les cultures mises à une température constante de 33°C.
- le cycle de température allant de 33 à 15°C favorise l'accumulation d'aflatoxine B_1 ;
- le cycle de température allant de 25 à 15°C, de même qu'une période à la température constante de 25°C, favorisent la production d'aflatoxine G_1 . Il a été observé que la production d'aflatoxine G_1 était proportionnelle à la période d'incubation à 25°C.

Lin et al. supposent que le système enzymatique responsable de la conversion de l'aflatoxine B_1 en G_1 est plus efficace à 25°C qu'à 33°C.

— Influence de la lumière : le facteur lumière associé à la température a été étudié, et ce facteur influence d'une manière non négligeable la produc-

tion d'aflatoxines qui a été trouvée maximale dans les conditions d'obscurité et à 30°C.

— Influence de la composition de l'air : Il a été observé que la croissance fongique avait lieu ainsi que la production d'aflatoxines dans des conditions de très basse tension d'oxygène, et même en milieu anaérobie avec flux d'azote. Vollbrecht et El Nawawy (128) considèrent que le développement fongique et la sécrétion de toxines par la fermentation est le moyen utilisé par les microorganismes pour répondre aux limitations de l'approvisionnement en oxygène.

Par contre, on n'a pas observé de production d'aflatoxines dans un milieu favorable (contenant des vitamines B) où ne passe aucun flux gazeux (ni oxygène, ni azote) mais où l'atmosphère s'enrichit en CO₂. Ceci montre bien la primordialité d'un flux gazeux pour la production d'aflatoxines et l'influence négative d'une atmosphère riche en CO₂ sur cette production.

Il convient de souligner la difficulté de tirer des conclusions fiables, à partir de toutes ces expériences du fait de la diversité des souches d'*A. flavus* et d'*A. parasiticus* utilisées, ne réagissant pas de la même façon sous les mêmes conditions de culture. De plus, du fait du nombre important des facteurs influençant la croissance fongique et la production de métabolites toxigènes, il est difficile de pouvoir les fixer dans les conditions d'expérience, afin de voir l'influence d'un seul de ces facteurs.

Tout ceci amène parfois à des résultats contradictoires. Ce sont les cas de l'influence du fer (120, 121), de l'influence de la lumière (116, 117, 118) sur la production d'aflatoxines.

1.1.2.2. - Influence d'un milieu compétitif

Quelques travaux se sont portés sur l'influence de certains microorganismes, placés dans le même milieu de culture avec *Aspergillus flavus* ou *Aspergillus parasiticus*, sur leur croissance fongique et leur production d'aflatoxines. Une inhibition de la croissance fongique et de la production de toxines a été observée avec certains microorganismes (par exemple : *Rhizopus nigricans*, *Saccharomyces cerevisiae*). A l'inverse, une stimulation fut observée avec *Acetobacter aceti*.

Ces résultats montrent la grande variabilité de la production d'aflatoxines par *A. flavus* et *A. parasiticus* dans un environnement compétitif, même lorsque le substrat est favorable à la croissance fongique et à la production d'aflatoxines. Le tableau suivant résume les diverses études expérimentales faites à ce sujet.

Influence de certains microorganismes sur la croissance d'*A. flavus* et *A. parasiticus* et sur leur production d'aflatoxines.

Facteurs	Croissance fongique	Production d'aflatoxines	Rf.
<i>Aspergillus parasiticus</i> :			
Substrat favorable			129
- <i>Rhizopus nigricans</i>	Inhibition	Inhibition de la production	
- <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Inhibition	Inhibition de la production	
- <i>Brevibacterium linens</i>	Faible inhibition	Faible inhibition de la production	
- <i>Acetobacter aceti</i>	Stimulation	Stimulation de la production	
<i>Aspergillus flavus</i> + <i>Bacillus subtilis</i> t°C = 20°C, HR = 30 %		Diminution de 27 % de la production d'aflatoxines par rapport à celle avec <i>A. flavus</i> seul	115

1.1.2.3. - Influence des insecticides et autres molécules

Divers insecticides et herbicides ainsi que d'autres molécules (dérivés de l'acide benzoïque) ont été expérimentés pour déceler une influence possible sur la croissance fongique d'*A. flavus* et *A. parasiticus* et leur production d'aflatoxines. La plupart des insecticides examinés, à une certaine concentration, inhibent la production d'aflatoxines (Naled, Landrin, Sevin), parfois d'une manière complète (Dichlorvos). L'aflatoxine B₁ a été trouvée la plus résistante aux insecticides, suivie par la G₁, G₂ et B₂, respectivement (130). Toutefois, certains insecticides (Dursban, Nellite) et herbicides (type Pyridazinone) ont un effet stimulateur sur la production d'aflatoxines. A ce sujet, Draughon (131) souligne que certains insecticides actuellement appliqués sur les récoltes, pouvaient stimuler la croissance fongique et la production d'aflatoxines par *Aspergillus spp.* En 1979, des chercheurs en Caroline du Sud trouvèrent que le maïs, sur lequel de la Lasso Atrazine et du Sutan avaient été pulvérisés, avait une incidence de contamination par les aflatoxines de 75 % tandis que le maïs qui n'avait pas reçu de pulvérisation avait une incidence de 30 % (132).

Du fait de leur inhibition importante sur la croissance fongique et sur la production de toxines, certaines molécules, dérivés de l'acide benzoïque, telles que le méthylbenzoate, l'éthylbenzoate, pourraient être utilisées en tant que fongicides, spécialement contre la croissance de souches aflatoxinogènes d'*Aspergillus*, sous réserve de l'absence de toxicité des résidus aromatiques (133).

La caféine et la théophylline sont des inhibiteurs effectifs de

la production d'aflatoxines, expliquant l'absence d'accumulation de ces toxines sur les fèves de cacao aux cours de conditions naturelles (134). Du fait que le groupe des méthylxanthines inhibe l'activité de la phosphodié-
térase, enzyme qui catalyse l'hydrolyse de l'AMP cyclique, cela laisse sup-
poser que la biosynthèse des aflatoxines est influencée par la concentration
de l'AMP cyclique à l'intérieur de la cellule fongique (135). Le tableau
suivant rassemble les résultats de divers insecticides, herbicides et autres
molécules sur la croissance fongique et la production d'aflatoxines.

Facteurs	Croissance fongique	Production d'aflatoxines	RE.
<i>Aspergillus flavus</i> : Dichlorvos à 10 µg/ml dans un milieu Dichlorvos à 20 µg/ml sur du riz, maïs, blé et cacahuètes		Inhibition complète Inhibition importante	136
<i>Aspergillus parasiticus</i> en milieu liquide : Insecticides : Naled-Dichlorvos- Landrin-Sevin-Pyrethrum-Malathion- Diazinon à 100 ppm (100 µg/ml)		Inhibition significative, à plus de 95 % pour le Naled et le Dichlorvos	130
Naled-Dichlorvos-Sevin-Landrin- Pyrethrum à 10 ppm (10 µg/ml)		Inhibition significative, à plus de 95 % pour le Naled et le Dichlorvos	130
<i>Aspergillus flavus</i> : Insecticides : Duraban Nellite Dicrotophos	Augmentation de 43 %	Augmentation en milieu liquide Augmentation en milieu liquide Aucune influence	131
Tolnaftate : 10-100 µmoles		Forte inhibition	137
<i>A. flavus</i> et <i>A. parasiticus</i> : Herbicides type Pyridazinone	Aucun effet	Production plus élevée pour <i>A. parasiticus</i> Production plus basse pour <i>A. flavus</i>	132
<i>A. flavus</i> et <i>A. parasiticus</i> Dérivés de l'acide benzoïque : méthylbenzoate, éthylbenzoate, trans-cinnamaldéhyde, acide sali- cylique, acide trans-cinnamique	Réduction	Réduction de la production	133
Acide anthranilique	Stimulation		133
<i>A. parasiticus</i> : Acide paraaminobenzoïque : 1 mM Acide paraaminobenzoïque : 10 mM Acide paranitrosalicylique : 1 mM Acide paranitrosalicylique : 10 mM Acide paranitrobenzoïque : 1 mM Acide paranitrobenzoïque : 10 mM Acide anthranilique : 10 mM Acide salicylique : 1 mM		Aucun effet Inhibition de 74 % de la produc- tion d'afl. B et G Stimulation de la production d'afl. B (26 %) et de G (8 %) Inhibition de 88 % de la produc- tion d'afl. B et G Stimulation de la production de 20 % Inhibition complète Inhibition de 85 % Inhibition de 38 %	138
<i>A. parasiticus</i> et <i>A. flavus</i> en milieu liquide :			139
Acide propionique : 4 ou 8 µg/ml	Inhibition à 100 %	Inhibition à 100 %	
Violet de cristal : 4 µg/ml	Faible inhibition (7 %)	Faible inhibition (12 %)	
8 µg/ml	Forte inhibition (83 %)	Forte inhibition (71 %)	
Propionate de calcium : 5 µg/ml	Stimulation (8 %)	Faible inhibition (17 %)	
10 µg/ml	Faible inhibition (3 %)	Faible inhibition (11 %)	
Propionate de sodium : 5 µg/ml	Stimulation (5 %)	Stimulation (4 %)	
10 µg/ml	Aucun effet	Faible inhibition (2,5 %)	

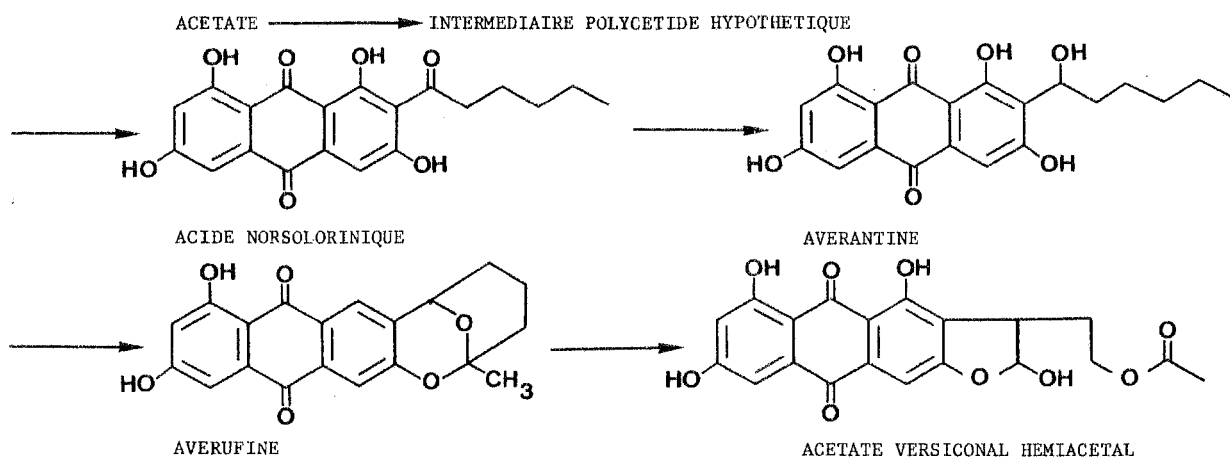
Cuivre (sulfate de cuivre) :			139
50 µg/ml	Faible inhibition (7 %)	Inhibition (48 %)	
100 µg/ml	Faible stimulation (2,5 %)	Inhibition (54 %)	
<hr/>			
<i>A. parasiticus</i> :			135
caféine : 0,5 mg/ml	Inhibition (18 %)	Inhibition à 86 %	
1,0 mg/ml	Inhibition (84 %)	Inhibition à 96 %	
2,0 mg/ml	Inhibition (83 %)	Inhibition à 100 %	
théophylline : 2,0 mg/ml	Inhibition (14 %)	Aucun effet	
4,0 mg/ml	Inhibition (13 %)	Aucun effet	
8,0 mg/ml	Inhibition (20 %)	Inhibition à 54 %	

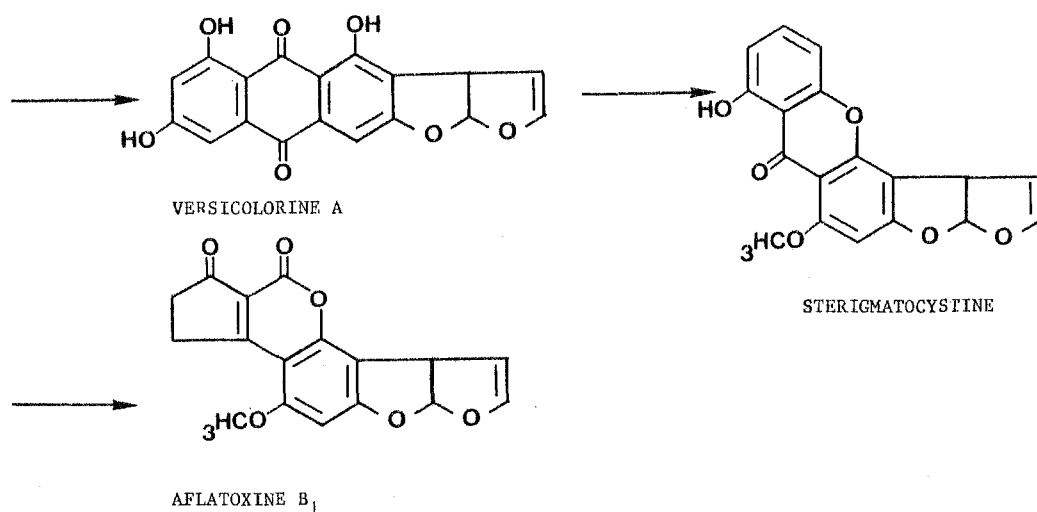
1.2. - Biosynthèse des aflatoxines

L'utilisation de mutants bloqués d'*Aspergillus flavus* et *parasiticus*, d'inhibiteurs métaboliques (en particulier l'insecticide organophosphate Dichlorvos (140)), de précurseurs marqués au ^{14}C et au ^{13}C et de systèmes de cellules libres sont les approches expérimentales majeures pour l'identification des intermédiaires dans la biosynthèse des aflatoxines (143,144). L'hypothèse d'une voie polycétide comme voie de biosynthèse de certains métabolites fongiques fut proposée pour la première fois par Birch et Donovan (141) et reprise plus tard par Birch (142) pour expliquer la biosynthèse des aflatoxines, ces molécules étant des monacétides.

Actuellement, les étapes générales de la biosynthèse des aflatoxines ont été bien établies et sont données dans la figure 2. La voie de biosynthèse de l'aflatoxine B_1 comprend les séquences suivantes : acétate \rightarrow intermédiaire polycétide hypothétique \rightarrow acide norsolorinique \rightarrow averantine \rightarrow averufine \rightarrow acétate versiconal hémiacétal \rightarrow versicolorine A \rightarrow stérigmatocystine \rightarrow aflatoxine B_1 (143, 144).

Fig. 2 : Biosynthèse de l'aflatoxine B_1 par la voie des polycétides.





En ce qui concerne l'aflatoxine B₂, des travaux de marquage réalisés par Heathcote et al. (145) indiquent une interconversion entre l'aflatoxine B₁ et B₂. Toutefois, certains rapports scientifiques notent que certaines souches d'*Aspergillus flavus* accumulent l'aflatoxine B₂, à l'exclusion de l'aflatoxine B₁ (146), débouchent sur l'évidence que la voie de biosynthèse de ces deux toxines peut diverger. Elsworthy et al. (147) montrent l'incorporation de ¹⁴C du groupement O-méthyl de la dihydrosterigmatocystine dans l'aflatoxine B₂ mais pas dans la B₁ d'*Aspergillus parasiticus*. Pour expliquer ce fait, Maggon et al. (148) ont proposé une voie pour l'aflatoxine B₂ par le versiconal, la versicolorine C et le 5-hydroxydihydrosterigmatocystine. Actuellement, les travaux sur l'aflatoxine G₁ concluent que cette toxine dérive de l'aflatoxine B₁ par oxydation (143).

Il est à souligner que beaucoup de détails manquent dans la biosynthèse des aflatoxines. Mais il est à espérer que les travaux ultérieurs faits dans ce domaine permettent une meilleure compréhension des diverses étapes de cette biosynthèse.

II - LES OCHRATOXINES

2.1. - Facteurs favorables à la biosynthèse des ochratoxines

Les deux facteurs primordiaux influençant la production des ochratoxines par certaines souches d'*Aspergillus* et de *Penicillium* sont la température et l'activité aqueuse (a_w). Au cours d'études sur la production d'ochratoxine A par *Aspergillus ochraceus*, la température optimale a été trouvée comprise entre 20° et 30°C (149). La production maximale a été observée

à 30°C, l'activité aqueuse (a_w) étant de 0,953 (soit 39 % d'humidité relative). A température moindre, par exemple à 15°C, l'humidité doit être supérieure ($a_w = 0,997$, soit 52 % d'humidité relative).

Le genre *Penicillium* comprend des espèces psychrophiles ; en étudiant l'influence de faibles températures d'incubation, on s'est aperçu que les souches de *Penicillium viridicatum* sont capables de produire de l'ochratoxine A entre 5° et 10°C (150). Cela explique les fortes contaminations par les ochratoxines observées sous les climats froids, principalement dues à des souches de *Penicillium*.

Northolt et Van Egmond (107) ont examiné récemment la croissance et la production d'ochratoxine A par certaines espèces fongiques (*Aspergillus* et *Penicillium*) sous les conditions maximales et minimales d'activité aqueuse (a_w) et de température pour lesquelles la croissance fongique a lieu avec possibilité de production d'ochratoxine A. Les tableaux suivants résument ces travaux (fig. 3).

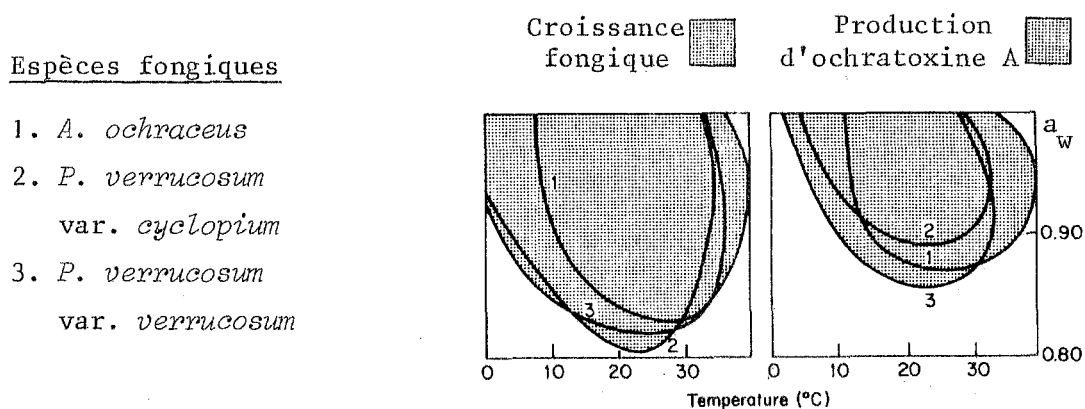


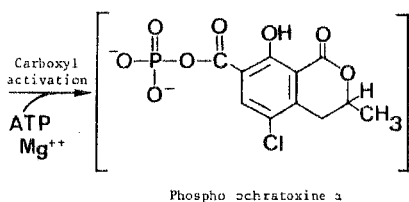
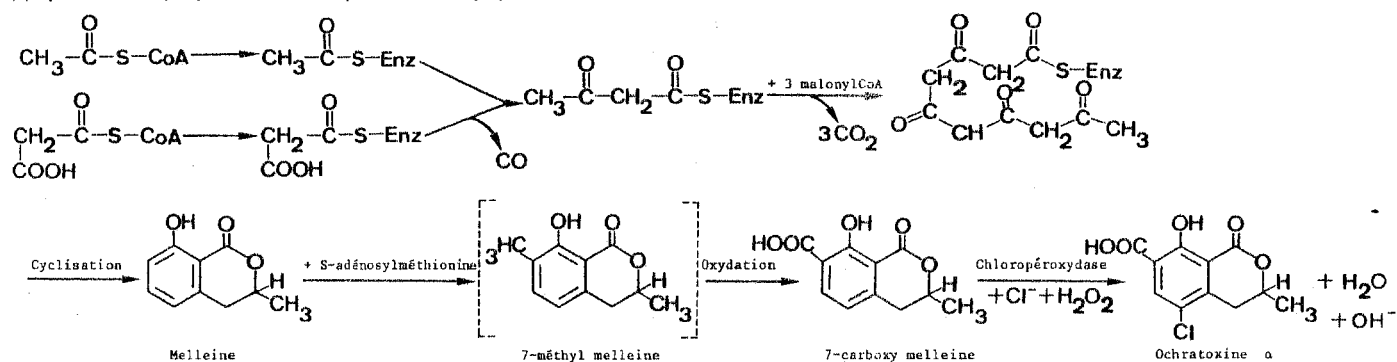
Fig. 3 : L'influence de l'activité aqueuse (a_w) et de la température sur la croissance et la formation d'ochratoxine A par quelques espèces fongiques (107).

L'ochratoxine A est produite dans une gamme plus petite d'activité aqueuse et de température, par rapport à celle de la croissance des espèces fongiques.

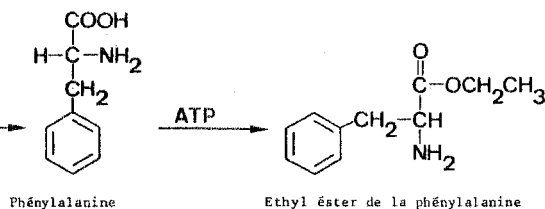
2.2. - Biosynthèse des ochratoxines

La synthèse des ochratoxines passe par la voie des polycétoacides comme les aflatoxines et la zéaralénone (Fig. 4). Brièvement, le schéma comprend la formation d'un pentacétide à partir d'acétylCoA et de malonylCoA, sa cyclisation et son aromatisation en une isocoumarine (la melleïne), puis méthylation et oxydation en dérivé carboxylé qui est chloré (on obtient

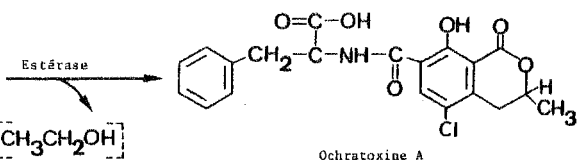
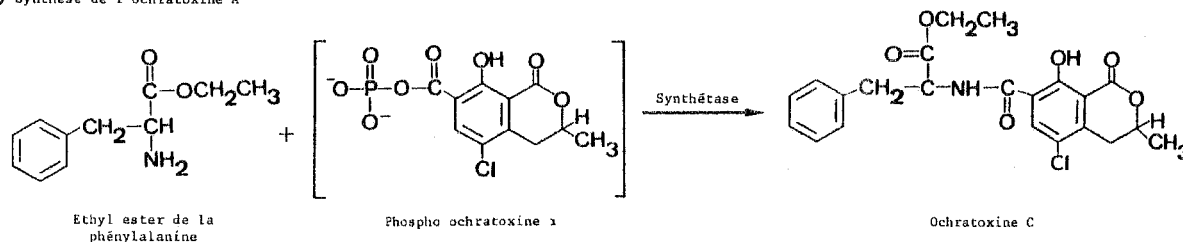
Fig. 4 : Biosynthèse des ochratoxines.

(1) Synthèse de la phospho ochratoxine α par la voie des polycétoacides

(2) Synthèse de la phénylalanine par la voie de l'acide shikimique



(3) Synthèse de l'ochratoxine A



NB : Les molécules mises entre [] n'ont pas été trouvées à l'état naturel.

l'ochratoxine α) avant de subir une acylactivation pour la réaction avec l'ester éthyl de la phénylalanine, la phénylalanine provenant de la voie de l'acide shikimique. L'ochratoxine A est considérée comme le produit final de la biosynthèse. Pratiquement aucune étape n'a été démontrée d'une manière satisfaisante malgré l'assurance avec laquelle elles sont décrites.

Il est à noter que le schéma présenté n'inclue pas la 4-hydroxy-melleine ou la 4-hydroxyochratoxine A qui ont été isolées de souches ochratoxinogènes. Toutefois, le schéma est suffisamment flexible pour incorporer une réaction d'addition du groupement hydroxy durant ou après la cyclisation en melleine, qui resterait intact durant la réaction de synthèse de l'ochratoxine A (151).

III - LA ZEARALENONE

3.1. - Facteurs favorables à la production de zéaralénone

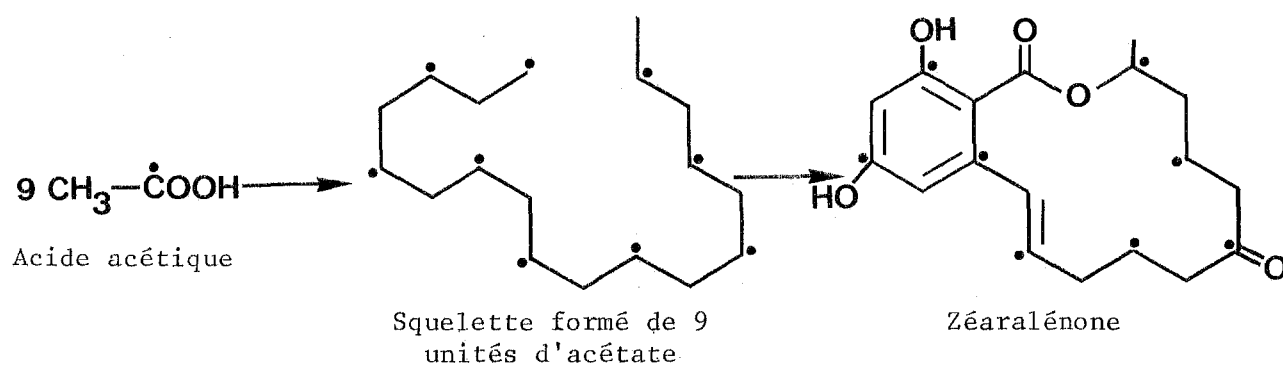
Le genre *Fusarium* nécessite pour son développement une activité aqueuse supérieure à 95 % (99). Une période de basse température ou alternée, température modérée - température basse, est nécessaire pour la production de toxine. Schroeder et Hein (152) rapportent que leur isolat de *Fusarium roseum* produit plus de zéaralénone à 25°C pendant 6 jours, suivis par 13 jours à 10°C.

Les souches fongiques produisent naturellement des concentrations maximales de zéaralénone lorsqu'elles croissent à des températures basses, par exemple 10-14°C. Toutefois, il y a quelques souches qui produisent d'abondantes concentrations de zéaralénone à une température normale. De plus, la plupart des souches fongiques produisent seulement des concentrations maximales de cette toxine lorsqu'elles croissent sur un milieu solide, par exemple le riz et le maïs, mais pas dans un milieu liquide défini (153).

3.2. - Biosynthèse de la zéaralénone

Des travaux de dégradation avec des atomes de carbone marqué au ^{14}C , l'utilisation du ^{13}C -RMN, ainsi que du spectromètre de masse, ont permis d'élucider la biosynthèse de la zéaralénone par les espèces fongiques concernées. Il apparaît clairement que la molécule entière de la zéaralénone est dérivée de 9 unités d'acétate par une réaction de condensation tête contre queue ("head to tail") (fig. 5).

Schéma de la biosynthèse de la zéaralénone.



Lieberman (154) trouve que le $^{14}\text{CO}_2$ est rapidement fixé et incorporé (en 3 minutes) dans la molécule de zéaralénone. D'autres expériences où le $^{13}\text{CO}_2$ est utilisé, montrent que l'un des produits de fixation du CO_2 est l'acide malique. Les analyses par spectrométrie de masse montrent que 17 % du $^{13}\text{CO}_2$ est incorporé dans la molécule de malate par le carbone 4 de l'acide malique.

Fusarium culmorum est capable de fixer le CO_2 par les enzymes, phosphoénol pyruvate carboxykinase et pyruvate carboxylase, comme cela a été démontré par Larmour et Marchant (155). La fixation du CO_2 par les espèces fongiques est un phénomène courant et la concentration de CO_2 fixé est appréciable. *Fusarium roseum*, comme *Fusarium culmorum*, fixent aussi le CO_2 probablement grâce aux mêmes systèmes enzymatiques. Ces deux enzymes fixent directement le CO_2 sur l'acide oxaloacétique. Après fixation sur l'acide oxaloacétique, Mirocha et Pathre (156) pensent que la molécule est rapidement convertie en acide malique, d'une manière réversible, par l'enzyme malate deshydrogénase. L'acide malique peut être décarboxylé en CO_2 et acétate par l'enzyme malicase, et ensuite, trouve sa place dans la molécule de zéaralénone par la voie des polycétoacides.

IV - LES TRICHOHECENES

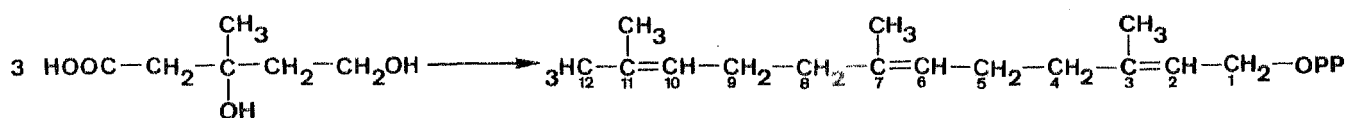
4.1. - Facteurs favorables à la biosynthèse des trichothécènes

En général, la synthèse de divers trichothécènes par le genre *Fusarium* a lieu après production d'une masse suffisante de mycélium, obtenue à température ambiante qui est favorable à la croissance fongique, suivie par une incubation à basse température ou par des conditions de stress. Les températures variant de 0°C à 15°C semblent donner la plus grande concentration pouvant aller jusqu'à 10 000 ppm de toxine (concentration basée sur le poids sec du substrat).

De plus, le milieu de culture intervient dans la production des trichothécènes, le milieu solide, riz ou maïs étant favorable. Ces toxines sont aussi produites à température normale dans un milieu liquide mais les concentrations sont faibles (157).

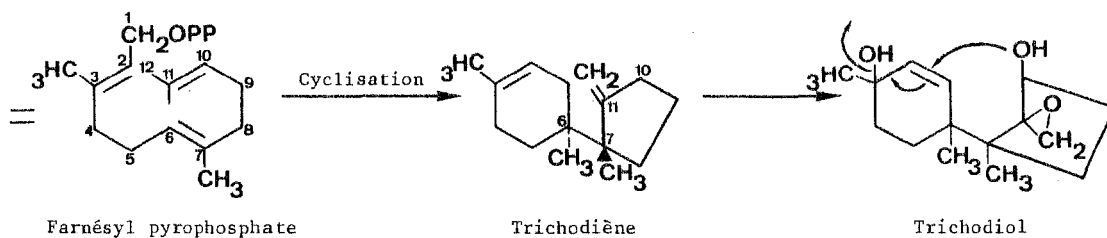
4.2. - Biosynthèse des trichothécènes

Le groupe des trichothécènes comprenant une quarantaine de molécules différentes mais ayant le même noyau, 12,13-époxy- Δ^9 -trichothécène, la biosynthèse de ce noyau sera traité par l'exemple de la trichothécine, qui est la première toxine du groupe des trichothécènes à avoir été isolée (Fig. 6) (158).



Acide mévalonique

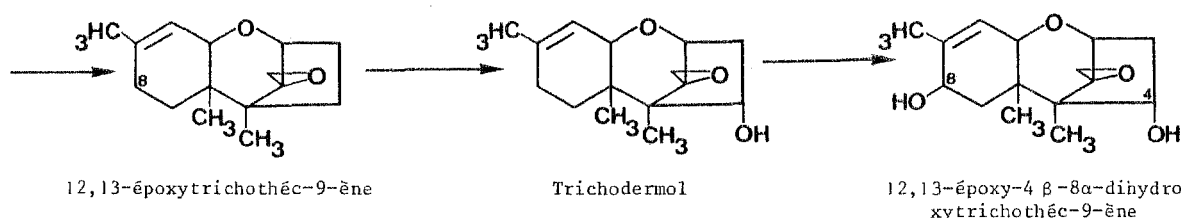
Farnésyl pyrophosphate



Farnésyl pyrophosphate

Trichodiène

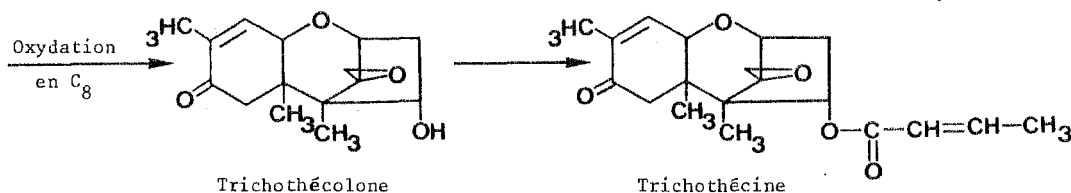
Trichodiol



12,13-époxytrichothéc-9-ène

Trichodermol

12,13-époxy-4β-8α-dihydroxytrichothéc-9-ène



Trichothécolone

Trichothécine

En résumé, la biosynthèse de la trichothécine comprend les séquences suivantes :

3 acides mévaloniques \rightarrow farnésylpyrophosphate \rightarrow trichodiène \rightarrow 12,13-époxytrichothéc-9-ène \rightarrow trichodermol \rightarrow 12,13-époxy-4β,8α-dihydroxytrichothéc-9-ène \rightarrow trichothécolone \rightarrow trichothécine.

Il a bien été établi que le squelette trichothécène est formé de 3 molécules d'acide mévalonique par la voie usuelle de la biosynthèse des lipides incluant isopentényl, géranyl et farnésyl pyrophosphate. La chaîne ouverte du squelette farnésyl se cyclise pour former la molécule parente des séries des trichothécènes, le trichodiène. La structure du trichodiène a été démontrée par Nozoe et Machida (159).

En ce qui concerne la formation du trichodiol à partir du trichodiène, le mécanisme n'a pas été prouvé bien qu'il soit tentant de suggérer la formation d'hydropéroxyde en C₁₁ comme intermédiaire fugace.

CONCLUSION

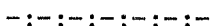
Bien que les étapes générales de la biosynthèse des diverses myco-

toxines soient maintenant établies, certaines restent encore hypothétiques et demandent à être confirmées au cours d'études ultérieures.

La signification ou l'avantage de la biosynthèse des mycotoxines vis à vis de la physiologie et de la reproduction des espèces fongiques toxigènes restent obscurs : pourquoi ces souches produisent-elles ces toxines ? On s'est beaucoup interrogé sur le rôle exact que pouvaient avoir les mycotoxines dans la vie du champignon. Synthétisées au cours de l'idiophase, les toxines sont des métabolites secondaires non indispensables à la vie de la cellule. Elles n'ont pas une fonction de matériel de réserve pour le microorganisme puisqu'elles sont rarement métabolisées et ne sont pas des produits de déchets du métabolisme cellulaire puisqu'elles n'apparaissent pas au cours de la trophophase. L'hypothèse la plus vraisemblable est qu'elles jouent le rôle de "valve shunt" (produits de débordement). Cela suppose, évidemment, qu'en dépit des mécanismes de contrôle et de régulation, les cellules fongiques en fin de trophophase se trouvent exposées à la mort en fonction d'une accumulation importante de précurseurs de base (acétate, malonate, pyruvate et acides aminés) non utilisés en raison de l'arrêt de croissance ; la cellule parviendrait à dévier son métabolisme et à synthétiser des métabolites secondaires, sorte de voie de détoxification pour la moisissure (2).

Les études portant sur les facteurs favorables à la production des mycotoxines ont permis de connaître les conditions nécessaires à cette production. En jouant sur ces facteurs, les risques de contamination de certaines denrées alimentaires peuvent être minimisés. Lorsque ces toxines sont accidentellement absorbées par l'animal ou l'homme, elles subissent une métabolisation et provoquent un certain nombre d'effets : c'est ce qui fait l'objet du chapitre suivant.

CHAPITRE III



METABOLISME DES MYCOTOXINES

INTRODUCTION

L'étude de l'absorption, de la distribution tissulaire, de la métabolisation et de l'excrétion des mycotoxines chez diverses espèces animales a permis de comprendre les effets toxiques provoqués par ces métabolites fongiques au niveau de certains organes.

Ces études du métabolisme se basent sur des observations faites lors d'intoxications naturelles chez l'animal et parfois chez l'homme, mais surtout sur des observations faites lors d'intoxications expérimentales chez l'animal pour ensuite extrapoler ces résultats à l'homme.

I - LES AFLATOXINES1.1. - Absorption

D'après toutes les observations concernant ce sujet, la voie d'absorption majeure des aflatoxines chez les animaux et chez l'homme, est celle du tractus gastro-intestinal par ingestion de denrées alimentaires contaminées.

Il a été signalé des cas d'exposition respiratoire aux aflatoxines (3), mais des renseignements plus précis manquent à ce sujet.

1.2. - Distribution tissulaire1.2.1. - Etude chez l'animal

Chez l'animal, la distribution tissulaire a été étudiée avec de l'aflatoxine B₁ à noyau marqué par ¹⁴C. Wogan et son équipe (160) ont injecté une dose intrapéritonéale de 0,07 mg/kg p.c. à un rat. 24 heures après cette injection, le rat avait retenu environ 20 % de la radioactivité administrée. La concentration maximale a été relevée dans le foie, où était ras-

semblée une radioactivité équivalente à celle de tout le reste de la carcasse (= 5-8 % du ^{14}C total récupéré).

Toutes les autres expériences faites dans ce domaine soulignent la prédominance de la fixation de la radioactivité au niveau du foie. Des résidus radioactifs ont été aussi détectés au niveau des reins, des tissus musculaires et adipeux (161, 162).

1.2.2. - Etude chez l'homme

Des taux élevés d'aflatoxines ont été décelés chez des sujets atteints de cancer du foie ou d'affections hépatiques diverses (3).

1.3. - Transformation et activation métaboliques

A une exception près, toutes les biotransformations primaires de l'aflatoxine B_1 impliquent sa conversion en métabolites hydroxylés dont un seul, l'aflatoxine M_1 , est appréciablement toxique par voie orale. 3 points importants régissent la transformation et l'activation métabolique des aflatoxines :

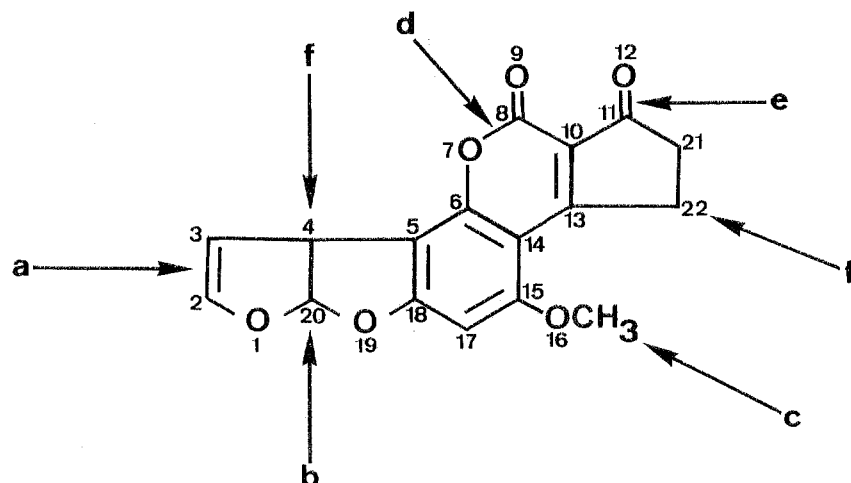
a) Ces molécules sont des dérivés de la coumarine et donc possèdent une fonction lactone qui peut être hydroxylée en milieu alcalin, leur faisant perdre leur toxicité.

b) Certaines aflatoxines possèdent, à l'extrémité des groupes furanniques, une double liaison qui peut être oxydée conduisant à des métabolites toxiques donnant lieu à la formation d'un époxy très réactif.

c) Ces molécules possèdent un double cycle furannique permettant :

- des interactions spécifiques des aflatoxines avec des constituants cellulaires (ADN, ARN),
- une diminution de la toxicité des aflatoxines par rupture d'un de ces cycles.

Ainsi, l'aflatoxine B_1 va subir des biotransformations, certaines ayant pour but de diminuer son taux dans l'organisme. En général, la détoxification de telles molécules résulte de la formation de dérivés plus polaires qui peuvent ou non, ultérieurement se conjuguer avec des aminoacides, l'acide glucuronique, un groupement sulfate ou des acides biliaires aidant ainsi leur excrétion. Le schéma suivant résume les diverses réactions de biodégradation de l'aflatoxine B_1 (163).



Biodégradation de l'aflatoxine B₁

- (a) Attaque par des molécules d'hydrogène et d'eau sur la double liaison 2-3.
- (b) Ouverture du double cycle furannique.
- (c) O-déméthylation.
- (d) Coupure de la liaison C₈-O₇ du cycle coumarinique.
- (e) Réduction du cyclopenténone.
- (f) Hydroxylation.

Dans le métabolisme hépatique de l'aflatoxine B₁ (Fig. 7) on trouve :

- des biotransformations majeures (m) que catalysent des enzymes microsomiales du foie, en particulier les monooxygénases à cytochrome P 450.
- des biotransformations exceptionnelles (c) du fait qu'elles exigent l'intervention d'une déshydrogénase cytoplasmique NADH dépendante.

D'autres biotransformations vont conduire à des dérivés directement toxiques. Ce sont les dérivés hydroxy-2 et dihydro-2,3 des aflatoxines B₁ et G₁, dénommés aflatoxines B_{2a} et G_{2a}. Ces deux métabolites se fixent fortement aux protéines. Jusqu'à présent, seuls ont été observés des signes indirects de la formation des époxydes des aflatoxines B₁ et G₁, mais il s'agit probablement là de la forme la plus importante d'activation métabolique. Par incubation de l'une ou de l'autre des toxines mères avec les microsomes hépatiques de nombreuses espèces animales et de l'homme, il se forme un métabolite dont l'existence paraît éphémère, qui est fortement réactif. Ce métabolite s'associe à l'ADN par covalence et induit une mutation bactérienne dans un second système d'épreuve *in vitro* (3). Il n'a pas été isolé, mais son dérivé dihydrodiol-2,3 a été caractérisé à la suite de l'hydrolyse acide ménagée d'un adduct formé au moment de la constitution du métabolite microsomal en présence d'ADN ou d'ARN ajouté.

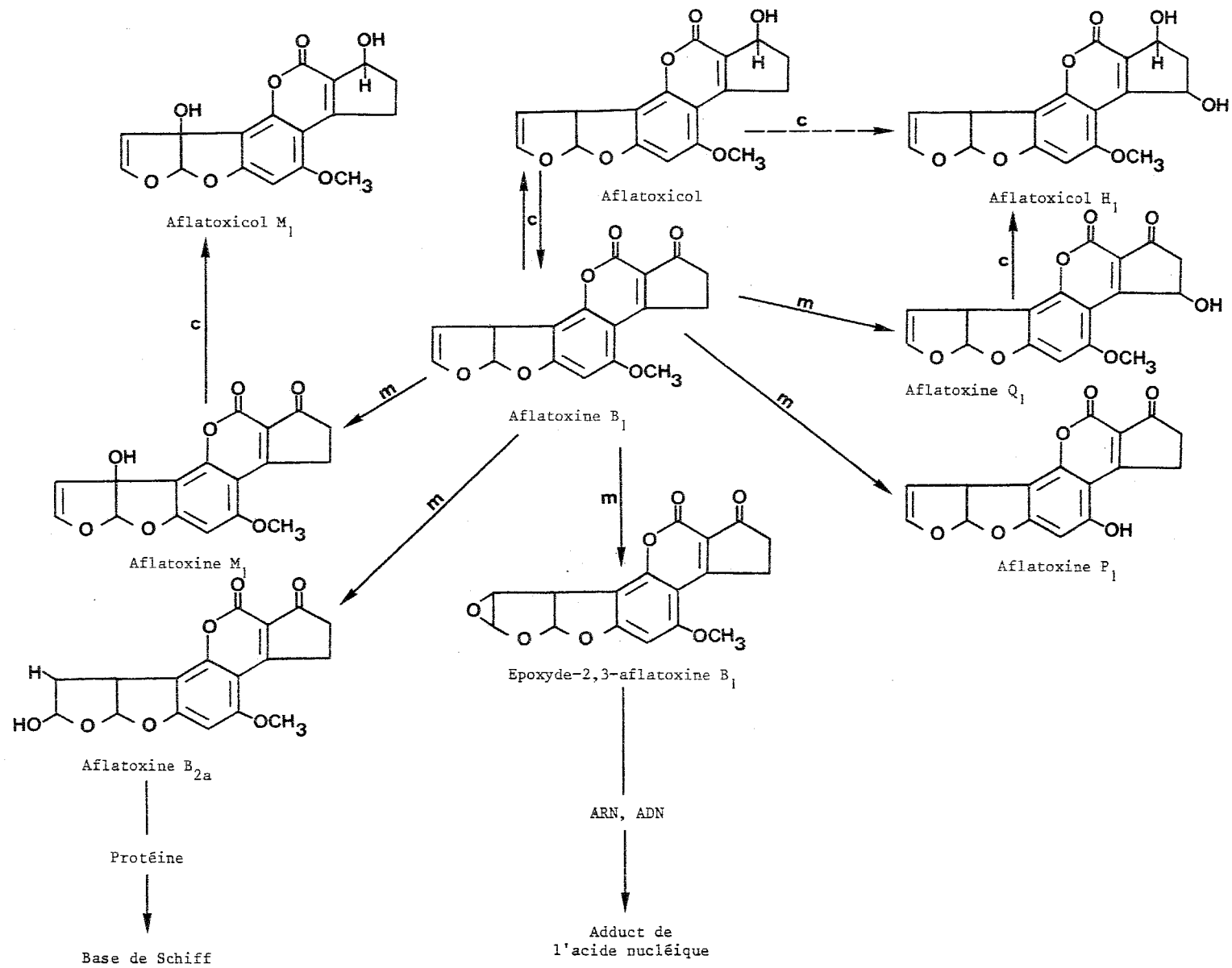


Fig. 7 : Métabolisme hépatique de l'aflatoxine B₁ (3)

D'après ces expériences, il est donc admis que c'est l'époxyde de l'aflatoxine B₁ qui est l'agent mutagène et cancérigène chez l'homme et l'animal.

1.4. - Excrétion

1.4.1. - Etudes chez l'animal

Wogan et son équipe ont traité ce sujet en travaillant sur des rats (160), en se servant d'aflatoxine B₁ à noyau ou à groupement méthoxy marqué au ¹⁴C qu'ils injectaient en dose unique par voie intrapéritonéale. Les résultats sont les suivants :

- en 24 heures, le rat excrète de 70 à 80 % de la dose injectée.
- l'excrétion de l'aflatoxine B₁ à noyau marqué se fait principalement par la voie biliaire dans les matières fécales (60 %) dans l'urine (20 %) et par l'air exhalé sous forme de ¹⁴CO₂, à l'état de traces.

Par contre, environ 25 % de la radioactivité du matériel à groupement méthoxy marqué ont été retrouvés sous forme de ¹⁴CO₂ dans l'air exhalé, la proportion d'excrétion dans les fèces étant simultanément réduite, ce qui montre l'importance de la O-déméthylation en tant que voie métabolique de l'aflatoxine B₁ chez le rat.

Des recherches relatent l'excrétion de l'aflatoxine M₁ dans le lait d'animaux fermiers (gros bétail, brebis, chèvres) nourris de produits contaminés par l'aflatoxine B₁ (Chap. I, Sect. 1.2.2.1.). Patterson (163) a trouvé une relation linéaire entre la quantité d'aflatoxine B₁ ingérée quotidiennement et le taux d'aflatoxine M₁ retrouvé dans le lait (Fig. 8) montrant qu'environ 1,5 % de l'aflatoxine B₁ est excrétée sous forme de métabolite M₁ et que le taux d'aflatoxine B₁ dans le lait est approximativement 300 fois plus faible que dans la ration alimentaire quotidienne. Des quantités moindres d'aflatoxine B₁ non métabolisée, ont été retrouvées dans le lait de vache et de brebis (3).

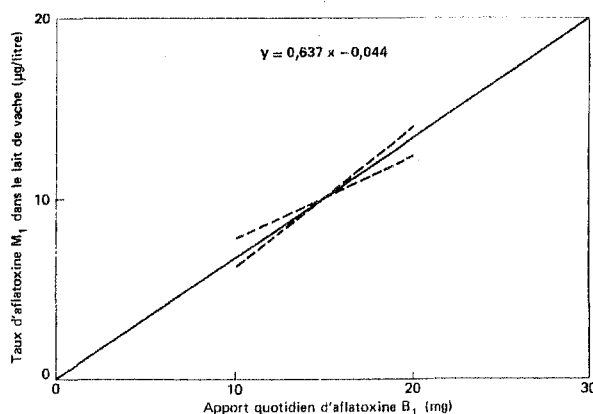


Fig. 8. Relation entre l'apport quotidien d'aflatoxine B₁ et le taux résultant d'aflatoxine M₁ dans le lait de vache, d'après les données expérimentales publiées. En traits discontinus les limites de confiance à 98% de probabilité pour la pente de la droite calculée (163)

1.4.2. - Etudes chez l'homme

Les renseignements concernant l'excrétion des aflatoxines chez l'homme sont rares. Aux Philippines, de l'aflatoxine M₁ a été retrouvée (mais non dosée) dans l'urine de personnes connues pour avoir ingéré du beurre de cacahuètes contaminé par des aflatoxines (164).

II - LES OCHRATOXINES

2.1. - Absorption

Galtier (165), lors d'une étude menée sur des rats exposés par gavage à une dose unique d'ochratoxine A de 10 mg/kg p.c., a trouvé que la concentration d'ochratoxine A inaltérée était maximale dans la paroi gastrique pendant les 4 premières heures suivant l'administration. Cette absorption gastrique prépondérante s'explique par la nature acide de l'ochratoxine A (dont le pK_a est de l'ordre de 7,05) et les pH respectifs siégeant dans l'estomac et le plasma, en se référant à la formule de Jacobs définissant le partage d'un acide faible entre 2 milieux (A et B) de pH différents (pH_A et pH_B).

$$\frac{\text{Concentration A}}{\text{Concentration B}} = \frac{1 + 10^{(\text{pH}_A - \text{pK}_a)}}{1 + 10^{(\text{pH}_B - \text{pK}_b)}} \quad (80)$$

A part la concentration maximale dans la paroi gastrique, l'intestin grêle, le gros intestin et le coecum contenaient de faibles quantités d'ochratoxine A. De petites quantités (1-3 % de la dose totale) d'ochratoxine α ont été décelées dans le coecum et le gros intestin. En effet, la transformation de l'ochratoxine A en ochratoxine α, métabolite peu toxique *in vivo*, selon la réaction :

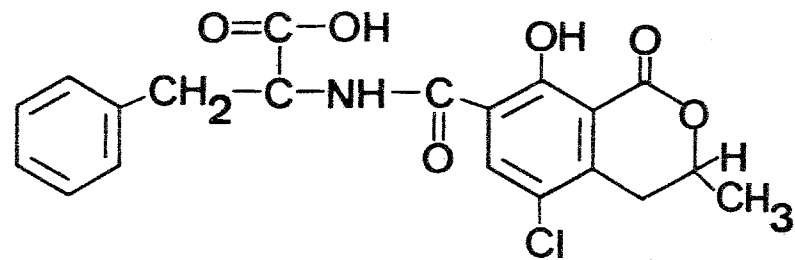


siège essentiellement au niveau du coecum et du gros intestin, la flore microbienne intestinale devant être responsable de cette hydrolyse (80).

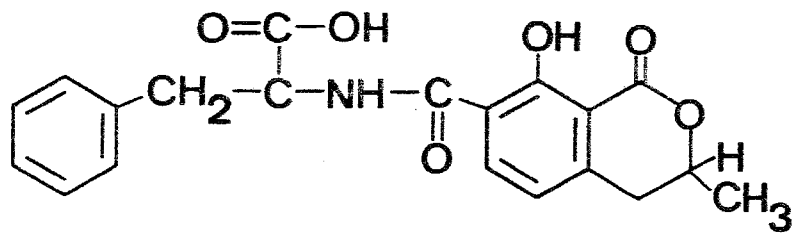
En ce qui concerne l'ochratoxine B, elle est absorbée au niveau gastrique comme l'ochratoxine A, mais beaucoup moins rapidement. Par contre, elle est plus facilement hydrolysée au niveau du gros intestin que l'ochratoxine A. Au sujet des taux d'absorption des ochratoxines A, B et α au niveau du tractus gastro-intestinal, on manque de renseignements.

2.2. - Distribution tissulaire et conversion métabolique

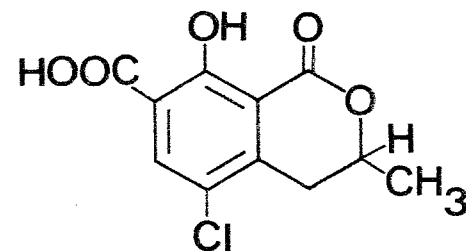
Les résultats de la distribution tissulaire des ochratoxines A et



Ochratoxine A



Ochratoxine B



Ochratoxine α

Formule chimique des ochratoxines A, B et α .

α chez le rat après administration, d'après les travaux de Galtier (80), sont les suivants :

	1 heure		24 heures		96 heures	
	OA	O α	OA	O α	OA	O α
Estomac	48,1	ND	24,6	ND	1,1	ND
Petit intestin	4,7	ND	1,8	ND	0,8	ND
Coecum	ND	ND	1,1	1,5	0,2	1,0
Gros intestin	ND	ND	1,0	1,1	0,2	0,9
Reins	0,1	ND	0,3	ND	0,3	ND
Foie	0,5	ND	1,4	ND	0,9	ND
Muscle	1,1	ND	1,7	ND	0,6	ND

Distribution tissulaire des ochratoxines A et α chez le rat (en p. 100 de la dose totale administrée) 1, 24 et 96 heures après l'administration de toxine.

OA : ochratoxine A - O α : ochratoxine α - ND : présence non détectée.

L'ochratoxine A est également présente à l'état de traces dans le cerveau, le thymus, le poumon, le pancréas, la rate et les testicules.

Patterson a observé, lorsqu'il administrait un mélange contenant de l'ochratoxine A et B à des porcs, que l'ochratoxine A, mais pas l'ochratoxine B, s'accumulait dans les reins, le foie et les muscles par ordre décroissant (166) confirmant les résultats de Krogh (83).

En travaillant sur des rats recevant 10 mg/kg d'ochratoxine A par tubage oesophagien (80), Galtier remarqua que, parmi les liquides biologiques, le plasma était le plus riche en toxine. Les recherches se sont poursuivies sur l'interaction protéines sériques - ochratoxine. Et un essai électrophorétique permit de déterminer la protéine responsable du transport de l'ochratoxine A dans le sang. Ainsi, l'albumine paraît être le transporteur principal de cette toxine dans l'organisme, ce qui confirme les essais *in vitro* réalisés par Chu (167) sur l'interaction ochratoxine A - albumine sérique bovine.

La liaison aux protéines plasmatiques entraîne des conséquences sur la réception du toxique dans l'organisme et sur sa toxicité. En effet, la présence d'une importante forme liée de toxine dans le compartiment intravasculaire entraînera des concentrations intracellulaires et extracellulaires toujours inférieures aux concentrations plasmatiques, à moins qu'il n'existe une fixation plus importante encore du toxique sur certaines protéines intracellu-

laïres. D'autre part, l'ochratoxine A, fixée sur l'albumine, peut constituer un antigène capable d'engendrer une sensibilisation de l'organisme ou encore, par la brusque séparation du complexe sous l'effet de compétiteurs de la toxine au niveau du site de fixation, peut entraîner une libération massive et létale du toxique dans l'organisme (80).

Des études menées au moyen d'ochratoxine A, marquée au ^{14}C , ont montré que dans l'organisme se forment également d'autres métabolites, mais ceux-ci n'ont pas encore été identifiés (3).

Au cours d'études expérimentales, Patterson et son équipe constatent qu'un taux faible d'ochratoxine α était absorbé au niveau intestinal et se retrouvait ultérieurement dans les urines (166). La question se pose actuellement : l'ochratoxine A représente-t-elle réellement le principe actif ou bien existe-t-il dans l'organisme animal une transformation en un métabolite particulièrement cytotoxique ?

2.3. - Excrétion

Des études faites sur le rat, à l'aide d'ochratoxine A marqué au ^{14}C , ont permis de constater que cette toxine est principalement excrétée dans l'urine et, dans des proportions plus faibles, dans les fécès (80). La présence de l'ochratoxine α dans les fécès s'explique par l'action préalable de la flore microbienne intestinale sur l'ochratoxine A (cf. Chap. 3, Sect. 2.1.) par contre, un mécanisme rénal de concentration urinaire doit être responsable de sa présence dans l'urine (80).

III - LA ZEARALENONE

3.1. - Absorption

D'après toutes les études et observations scientifiques, la voie d'absorption principale est celle du tractus gastro-intestinal. Mais, on manque de précision à ce sujet (3).

3.2. - Distribution tissulaire et activation métabolique

Ueno et son équipe ont étudié la distribution tissulaire de la zéaralénone en administrant par voie orale 2 mg/kg de ^3H -zéaralénone à des rates (168). La présence la plus importante de radioactivité se trouvait dans l'utérus et les ovaires. Les autres organes où se trouvait de la zéaralénone radioactive sont : le foie, le tissu adipeux, les muscles, les reins, le cerveau, les intestins, le sang (surtout le sérum).

De plus, un métabolite hydroxylé, dénommé métabolite (M.I) était détecté et semblait provenir de la biotransformation de la zéaralénone par des enzymes hépatiques. Ce n'est que plus tard qu' Ueno identifie la métabolite (M.I) qui est un mélange d' α -zéaralénol et de β -zéaralénol, la β - zéaralénol étant en faible quantité (169). Expérimentalement, l'activité oestrogénique de l' α -zéaralénol a été trouvée 3 fois plus élevée que celle de la zéaralénone.

Donc, il semble que les enzymes hépatiques transforment la zéaralénone en une molécule toxiquement plus active, l' α -zéaralénol, ce qui correspond à une activation métabolique de la zéaralénone en α -zéaralénol. Les enzymes hépatiques probablement responsables de cette transformation sont :

- la réductase NADH/NADPH-dépendante, localisée dans les microsomes hépatiques catalysant l'hydroxylation de la zéaralénone en α -zéaralénol.

- la réductase NADPH-dépendante, se trouvant dans le cytosol, intervenant dans la formation de l' α -zéaralénol et de la β -zéaralénol.

Le premier système enzymatique a un pH optimum d'activité de 4,5, le deuxième système enzymatique de 7,4. Il semble que d'autres systèmes enzymatiques, requérant des cofacteurs, interviennent dans l'hydroxylation de la zéaralénone (169).

La figure 9 donne la structure de la zéaralénone et de ses dérivés (169).

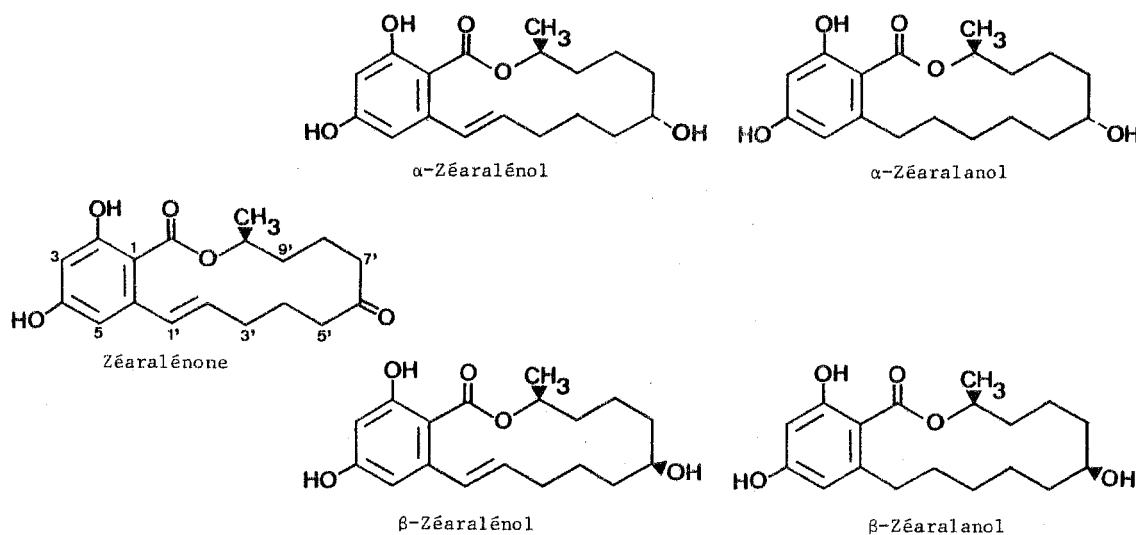


Fig. 9 : Structure de la zéaralénone et de ses dérivés.

3.3. - Excrétion

Dans son travail sur le métabolisme de la zéaralénone chez le rat et la souris (169), Ueno démontre, en administrant à ces animaux de la zéaralénone par voie orale, que cette toxine est principalement excrétée par les fécès sous forme libre et sous forme d' α -zéaralénol et de β -zéaralénol. Seulement 10 % de la dose initiale de zéaralénone se retrouve dans les urines sous forme de glucuronides. D'après la structure de la zéaralénone, qui comporte 2 groupements hydroxylés en position 2 et 4, il est très probable que l'un des glucuronides soit le 2 (ou 4)-glucuronide, et l'autre, le 2,4-bis-glucuronide.

IV - LES TRICHOHECENES

4.1. - Absorption

Des études réalisées sur des souris ont montré, en administrant de la fusarénone X par voie orale, que l'absorption se faisait rapidement au niveau intestinal (140, 141).

4.2. - Distribution tissulaire et conversion métabolique

La distribution tissulaire de la fusarénone X a été étudiée en administrant de la fusarénone X marquée à l' ^3H à des souris : 30 minutes après l'administration, la radioactivité a été décelée dans le foie, les reins, les intestins, l'estomac, la rate, la bile et le plasma, mais aucune présence dans le coeur, le cerveau et les testicules. La plus forte concentration se trouvait dans le foie (3 % de la dose administrée) (140). Les trichothécènes sont directement cytotoxiques, une fois absorbés par l'organisme, leur toxicité étant due principalement au noyau 12,13-époxytrichothécène (si ce noyau est coupé, il y a perte de toxicité) mais d'autres caractéristiques structurales interviennent dans la toxicité (141).

Lors d'études sur le métabolisme de la toxine T-2 et de la fusarénone X chez la souris, il a été montré que ces deux toxines subissent une déacétylation microsomale au niveau hépatique conduisant à leurs dérivés respectifs, la toxine HT-2 et le nivalénol, qui seront ensuite excrétés dans les urines. L'enzyme catalysant cette conversion est l'acétylcholine estérase (Fig. 10).

Il apparaît que les groupements esters du noyau trichothécène sont rapidement hydrolysés au niveau hépatique en leurs alcools respectifs et pro-

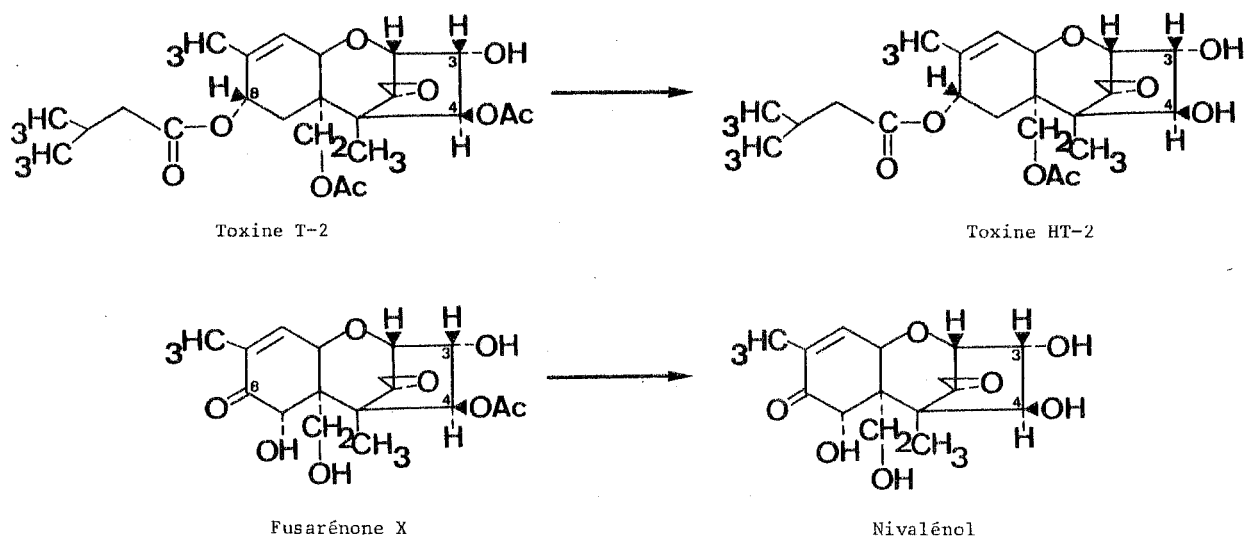


Fig. 10 : Déacétylation microsomale de la toxine T-2 et de la fusarénone X.

bablement excrétés dans les urines, mais cette hypothèse n'a pas été, pour l'instant, confirmée (3).

4.3. - Excrétion

Les trichothécènes sont rapidement éliminés de l'organisme, une fois absorbés, et principalement par les urines (après déacétylation pour certains, ou hydrolyse des groupements esters). Ils sont aussi excrétés par les fécès (3, 8).

CONCLUSION

Les études entreprises sur le métabolisme des principales mycotoxines ont permis de comprendre comment ces toxines parvenaient jusqu'à certains organes pour ensuite manifester leurs effets toxiques. Etant donné que la plupart des intoxications rencontrées chez les animaux et parfois chez l'homme, se font par l'ingestion d'aliments contaminés, les recherches se sont tournées vers l'absorption par voie orale, les principales mycotoxines étant absorbées à différents niveaux du tractus gastro-intestinal. L'étude de la distribution tissulaire a permis de montrer que de nombreux organes, en particulier certains organes vitaux (comme le foie, les reins), renfermaient ces mycotoxines à différents taux de concentration. Vue la richesse du foie en divers systèmes enzymatiques, cet organe est le centre de l'acti-

vation métabolique de certaines mycotoxines (aflatoxines, zéaralénone) et aussi le centre du métabolisme de toutes les autres.

Les voies d'excrétion de ces mycotoxines et de leurs dérivés métaboliques sont principalement la voie urinaire et aussi la voie fécale. Les progrès réalisés dans le domaine de l'analyse et du dosage permettent actuellement de détecter une mycotoxine dans une denrée alimentaire, de l'analyser et, enfin, de la doser, et ceci à des concentrations faibles, de l'ordre du ppb. Nous allons donc étudier les principales méthodes de dosage et aussi les méthodes de détection ou "screening" permettant non seulement de savoir si un aliment est contaminé, mais aussi de détecter rapidement si une souche fongique est toxigène ou non.

- a - Coefficient d'absorption molaire des aflatoxines B₁, B₂, G₁ et G₂, d'après Rodricks et al. (180) et de M₁ et M₂ d'après Stubblefield et al. (173).
- b - P représente les produits phénoliques de la O-déméthylation de l'aflatoxine B₁.
- c - Composés dissous dans le méthanol, sauf P₁ qui l'a été dans l'éthanol. Les données sur les coefficients d'absorption molaire correspondant aux autres pics et sur les caractéristiques du spectre d'absorption U.V. des aflatoxines dans d'autres solvants se trouvent dans les publications originales.
- d - D'après Butler (181).
- e - Non disponible.

Les aflatoxines sont très solubles dans les solvants modérément polaires (chloroforme et méthanol, par exemple) et surtout dans le diméthyl-sulfoxyde (solvant généralement utilisé comme vecteur pour administrer des aflatoxines aux animaux d'expérience).

1.2. - Les ochratoxines

Propriétés chimiques et physiques de quelques ochratoxines.

Ochratoxine	Formule moléculaire	Masse moléculaire relative	Point de fusion °C	Maximum d'absorption (nm) (Coeff. d'absorption)	Solubilité	Rf.
A	C ₂₀ H ₁₈ ClNO ₆	403	169 (xylène) 89-95 (benzène)	213 (36800) ; 322 (6400)	Solubilité dans les solvants organiques polaires, faiblement soluble dans l'eau et soluble dans une solution aqueuse de bicarbonate de sodium	182
B	C ₂₀ H ₁₉ NO ₆	369	221	218 (37200) ; 318 (6900)		183
α	C ₁₁ H ₉ ClO ₅	256	229	212 (30000) ; 338 (5600)		183

1.3. - La zéaralénone

Propriétés chimiques et physiques de la zéaralénone.

Formule moléculaire	Masse moléculaire relative	Point de fusion °C	Absorption dans l'UV (ε)			Solubilité	Emission fluorescente (nm)	Rf.
			236 nm	274 nm	316 nm			
C ₁₈ H ₂₂ O ₅	318	164 - 165	29700	13909	6020	Insoluble dans l'eau, le disulfure de carbone, le tétrachlorométhane. Soluble dans l'eau alcaline, éther benzène, chloroforme, dichlorométhane, acétate d'éthyle, acéto-nitrile et alcools. Faiblement soluble dans l'éther de pétrole.	360 bleu-vert 260 vert franc	184 185

1.4. - Les trichothécènes

Propriétés chimiques et physiques des 5 principaux trichothécènes.

Trichothécène	Formule moléculaire	Masse moléculaire relative	Point de fusion °C	Détection sur gel de silice (TLC) H ₂ SO ₄ concentré	de p. Anisaldéhyde	Solubilité	Rf.
Toxine T-2	C ₂₄ H ₃₄ O ₉	466	150 - 151	Gris	Marron	Solubles dans l'acétone, acé-	157
Fusarénone - X	C ₁₅ H ₁₂ O ₈	320	91 - 92	Pourpre → Marron	Pourpre	tate d'éthyle, chloroforme, acéto-nitrile, éthanol, méthanol. Insolubles dans l'eau, pétrole, éther. La solubilité dans le benzène, toluène et diéthyl éther varie selon les toxines.	
Nivalénol	C ₁₅ H ₂₀ O ₇	312	222 - 223	Pourpre → Marron	Pourpre		
Désoxynivalénol	C ₁₅ H ₂₀ O ₆	296	131 - 135	Jaune	Jaune canari		
Diacétoxyscirpénol	C ₁₉ H ₂₆ O ₇	366	162 - 164	Pourpre	Violet intense		

II - METHODES DE SCREENING DES MYCOTOXINES

Le screening a pour but de détecter la production ou non de toxines par des souches fongiques, ainsi que la présence ou non de ces toxines dans certaines denrées alimentaires. Cette méthode doit être simple, rapide, économique.

2.1. - Screening des souches toxigènes

En général, les méthodes de screening sont basées sur la production de toxines sur des substrats liquides ou solides, l'extraction de la toxine par des solvants dépendant des propriétés des toxines, peut être suivie par un processus de purification et finalement la solution contenant la toxine est concentrée et la toxine est détectée par TLC.

2.1.1. - Les aflatoxines

Filtenborg et Frisvald ont proposé, récemment, une méthode de screening simple et rapide, excluant l'extraction de la toxine du substrat, et basée sur le dépôt direct sur plaque TLC d'un échantillon du substrat solide contenant la toxine (186). De plus, cette méthode s'applique à l'ochratoxine A, la toxine T-2 et la zéaralénone.

Méthodes de screening de souches productrices d'aflatoxines.

Aflatoxines	Méthode	Temps requis	Limites de détection	Rf.
B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	Dépôt direct sur TLC d'un échant. de substrat solide contenant les toxines	6 jours	Afl. B ₁ : 0,1 ppm Afl. G ₁ : 0,1 ppm	186
B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	Extraction des toxines du substrat et dépôt sur TLC	4 jours	Afl. B ₁ : 0,0025 µg Afl. B ₂ : 0,0030 µg Afl. G ₁ : 0,0025 µg Afl. G ₂ : 0,0030 µg	187
B ₁ , B ₂	Extraction des toxines du substrat et dépôt sur TLC	72 heures	Afl. B ₁ : 0,0022 µg Afl. B ₂ : 0,0025 µg	188

B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	Extraction des toxines du substrat et dépôt sur TLC	N.D.	N.D.	189
Aflatoxines	Réduction de la germination de graines de lentilles mesurée par la valeur moyenne de l'indice de chlorose.	1 semaine	N.D.	190

2.1.2. - Les ochratoxines

Méthodes de screening de souches productrices d'ochratoxine A.

Ochratoxine	Méthode	Temps requis	Limites de détection	Rf.
A	Dépôt direct sur TLC d'un échant. de substrat solide contenant la toxine	6 jours	0,2 ppm	186
A	Extraction de la toxine du substrat et dépôt sur TLC	4 jours	0,01 µg	187
A	Extraction de la toxine du substrat et dépôt sur TLC	72 heures	0,0082 µg	188
A	Extraction de la toxine du substrat et dépôt sur TLC	N.D.	N.D.	189

2.1.3. - La zéaralénone

Méthodes de screening de souches productrices de zéaralénone.

Méthode	Temps requis	Limites de détection	Rf.
Dépôt direct sur TLC d'un échantillon de substrat solide contenant la toxine	6 jours	N.D.	186
Extraction de la toxine du substrat et dépôt sur TLC	4 jours	0,01 µg	187
Extraction de la toxine du substrat et dépôt sur TLC	N.D.	N.D.	189
Inhibition des larves de <i>Tenebrio molitor</i>	4 semaines	N.D.	191

2.1.4. - Les trichothécènes

Méthodes de screening de souches productrices de trichothécènes.

Trichothécènes	Méthode	Temps requis	Limites de détection	Rf.
Toxine T-2	Dépôt direct sur TLC d'un échant. de substrat solide contenant la toxine	6 jours	N.D.	186
Toxine T-2 Nivalénol Diacétoxyscirpénol	Extraction des toxines et dépôt sur TLC	N.D.	< 0,2 µg 0,2 µg 0,2 µg	189
Trichothécènes	Inhibition des larves de <i>Tenebrio molitor</i>	4 semaines	N.D.	191

(ND : Non déterminé).

2.2. - Screening de substrats contaminés

2.2.1. - Substrats végétaux contaminés par des aflatoxines

Méthodes de screening de substrats végétaux contaminés par des aflatoxines.

Aflatoxines	Denrées contaminées	Méthode	Remarques	Limites de détection	Rf.
Aflat. totaux (B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂)	Maïs blanc	Extraction, purification, Séparation et identification sur mini colonne type Velasco	Méthode ayant été adoptée comme première méthode officielle pour la détection d'aflatoxines dans les denrées alimentaires citées	10 µg/kg	192
	Maïs jaune			-	
	Farine de cacahuètes			-	
	Farine de graines de coton			-	
	Cacahuètes			-	
	Beurre de cacahuètes			-	
	Pistaches			-	
Aliments mélangés	-				
Aflat. B ₁	Farine de graines de coton	Extraction, purification, identification sur TLC	Méthode simple	5 µg/kg	193
Aflatoxines		Dégénérescence de cellules de poisson chat, <i>in vitro</i>	Méthode proposée comme screening des aflatoxines	0,02 µg/ml	194
Aflatoxines		Action létale des aflatoxines sur des daphnies	Méthode biologique proposée comme screening des aflatoxines, test rapide (24 heures)	0,1 ppb	195
Aflatoxines		Inhibition de la croissance de <i>Bacillus megaterium</i>	Méthode biologique utilisée en tant que screening, test rapide (15 heures)	Quantité d'échant. requis : 1 µg	196
Aflatoxines		Action létale des aflatoxines sur <i>Bacillus subtilis</i>	Méthode biologique utilisée en tant que screening, test rapide (12 heures)	Quantité d'échant. requis : 1 µmole	197

2.2.2. - Détermination des aflatoxines dans les tissus animaux

Plusieurs méthodes de recherche des aflatoxines dans le foie ont été publiées (198 - 199 - 200 - 201). Ces méthodes, soit demandent un temps considérable, soit n'ont pas la limite de détection exigée (≤ 1 ng/g) ou donnent des extraits finaux contenant des impuretés fluorescentes qui rendent difficile l'identification de faibles concentrations d'aflatoxines.

Stubblefield et Shotwell (202) ont mis au point une méthode de détermination des aflatoxines B₁ et M₁ (applicable aussi pour les aflatoxines B₂, G₁ et/ou G₂) dans les tissus animaux tels que le foie de boeuf, de porc, de poule et même d'humain, ainsi que le rein, la rate, les muscles et le sang de boeuf. Cette méthode comprend la dénaturation de l'échantillon avec de l'acide citrique qui est ensuite extrait avec du dichlorométhane. Après filtration, l'extrait est partiellement purifié sur une colonne de

gel de silice et les aflatoxines B₁ et M₁ sont déterminées par une chromatographie en couche mince bidimensionnelle et par densitométrie. La récupération des aflatoxines B₁ et M₁ dans les tissus et le sang est de 90 % et 80 % respectivement. Cette méthode est rapide, sensible et donne des extraits pour la TLC libres de substances gênantes. La limite de détermination est $\leq 0,1$ ng/g (202).

2.2.3. - Substrats contaminés par des aflatoxines et autres mycotoxines

Méthodes de screening de substrats contaminés par des aflatoxines et autres mycotoxines.

Mycotoxines	Denrées contaminées	Méthode	Remarques	Limites de détection	Rf.
Afl. B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂ Ochratoxine A Zéaralénone	Maïs Avoine, orge, blé, riz, maïs	Extraction, purification, séparation sur TLC	La meilleure séparation sur TLC fut obtenue avec benzène-acétate d'éthyle-acide formique (80:20:0,5)	Aflatox. : 5 µg/kg Ochratox. A : 10 µg/kg Zéaralén. : 35 µg/kg	203
Aflatoxine B ₁ Zéaralénone	Maïs	Extraction, purification, séparation sur TLC	Détermination en 10 à 20 minutes par échant. Récupération de l'aflatoxine dans l'échant. basse (20 %)	Aflatox. B ₁ : 5 ppb Zéaralén. : 200 ppb	204
Afl. B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂ Ochratoxines A, B et C Zéaralénone	Huile de maïs Huile d'olive Huile d'arachide Huile de soja Extrait de grains	Extraction, purification, séparation sur 2D-TLC	Purification par TLC avec benzène-hexane (3+1) Second développement sur TLC avec toluène-acétate d'éthyle-acide formique (6+3+1) ou benzène-acide acétique (9+1)	5 ppb d'afl. B ₁ dans le maïs	205
Afl. B ₁ Ochratoxine A Zéaralénone	Maïs	Extraction, séparation des 3 toxines puis dépôt sur TLC pour identification	Méthode assez rapide. Bonne sensibilité, récupération satisfaisante des toxines : afl. B ₁ (71 %), ochr. A (87 %), zéaralénone (85 %)	Afl. B ₁ : 2 ppb Ochr. A : 40 ppb Zéaralén. : 200 ppb	206
Afl. B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂ Ochratoxines A et B et leurs esters d'éthyle Zéaralénone	Maïs, orge Avoine, blé	Extraction, purification, séparation sur TLC	Limites de détection des diverses mycotoxines (µg/kg)		207
				Maïs Blé Orge Avoine Riz	
			Afl. B ₁ ou G ₁	20 20 20 20 20	
			Ochr. A ou B	45 90 90 90 90	
			Ester d'éthyle d'ochr. A ou B	50 100 100 100 100	
			Zéaralénone	200 400 500 500 500	

III - METHODES DE CONFIRMATION DES MYCOTOXINES

Les méthodes de confirmation des mycotoxines sont basées généralement sur les propriétés physiques, chimiques et toxicologiques de ces toxines.

3.1. - Les aflatoxines

3.1.1. - Méthodes de confirmation basées sur les propriétés chimiques des aflatoxines

Résumé des techniques basées sur les propriétés chimiques des aflatoxines.

Aflatoxines	Réactif	Produit	Méthode de détection	Limites de détection	Rf.
B ₁ , G ₁	HCO ₂ H/SOCl ₂ HOAc/SOCl ₂ CF ₃ CO ₂ H	"Adduct H ₂ O"	TLC - FL	0,25 µg B ₁	208
B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	2,4-Dinitrophénylhydrazine (DNPH) NH ₂ OH HCl	Phénylhydrazones Oximes	TLC	-	209
B ₁ , G ₁	H ₂ SO ₄ FeCl ₃		TLC - FL	-	210,211
B ₁ , G ₁	HOAc/SOCl ₂	Acétates	TLC - FL	-	212
B ₁ , G ₁	HCl/H ₂ O HCl/Ac ₂ O	"Adducts H ₂ O" Acétates	TLC - FL	20 ng B ₁ /G ₁	211,213
B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	p-anisaldéhyde	Produits de condensation	TLC - FL	-	189
B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	Di-O-anisidine-Chlorure de Tétrazolium	-	TLC - FL	0,03 µg B ₁ , B ₂ 0,09 µg G ₁ , G ₂	214
B ₁	I ₂	-	TLC - FL		215
M ₁ , M ₂	Ac ₂ O, pyridine	Acétate	TLC	0,04 ppb	216
B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	2,4-DNPH	Phénylhydrazones	TLC	-	217
M ₁		Acétate/Hémiacétal	TLC - FL	30 ng	218
B ₁ , G ₁	CF ₃ CO ₂ H	"Adduct H ₂ O"	TLC - FL	0,5 µg/kg	211,219
B ₁ , B ₂	NaBH ₄	Produit de réduction	TLC	-	220
M ₁	CF ₃ CO ₂ H	-	TLC - FL	1 ng	221
B ₁ , M ₁	CF ₃ CO ₂ H	-	2D - TLC	0,5 ng	222
M ₁	CF ₃ CO ₂ H	-	2D - TLC	0,3 ng/g	223
B ₁ , M ₁	CF ₃ CO ₂ H/C ₆ H ₆	-	2D - TLC	0,1 ng/g	224
B ₁	I ₂ /H ₂ O	-	HPLC - FL	-	225
M ₁	CF ₃ CO ₂ H	-	HPLC - FL	1 ng	226

3.1.2. - Méthodes de confirmation basées sur les propriétés physiques des aflatoxines

Plusieurs techniques basées sur les propriétés physiques des aflatoxines se sont développées pour confirmer ces toxines.

La technique la plus usuellement utilisée est basée sur la mesure des caractéristiques de migration de ces toxines sur TLC ou 2D - TLC en utilisant des systèmes de solvants de polarité variable. Les changements de Rf sont notés. Durackova et al. (227) ont fait une analyse systématique de 37 mycotoxines (dont les aflatoxines B₁, B₂, G₁, G₂, M₁) par TLC dans huit systèmes de solvants. Les valeurs des Rf dans les 8 systèmes de solvants, les réactions colorées après détection chimique et la détection sous UV sont no-

tées. Parfois, on utilise deux moyens de détection différents :

- une étape de détection par TLC et une étape de confirmation par HPLC.

- HPLC avec deux détecteurs différents, par exemple, un détecteur U.V. et un détecteur fluorescent mis en série (228) ou un détecteur U.V. et un détecteur électrochimique.

Les techniques U.V. et de fluorescence ont été appliquées aux aflatoxines isolées des cacahuètes et purifiées par TLC (229).

Deux nouvelles techniques fiables se sont développées, basées sur des mesures physico-chimiques. La première est la technique de spectroscopie en I.R., par laquelle un spectre satisfaisant d'aflatoxine B₁ est obtenu avec une quantité d'échantillon aussi faible que 8 µg (230). La deuxième technique comporte l'utilisation du spectromètre de masse qui permet une confirmation simple, plus certaine de l'identité des aflatoxines.

Depuis que certains rapports scientifiques soulignent que les propriétés chromatographiques de certaines substances d'extraction conduisent à de fausses identifications de l'aflatoxine B₁ (facteur "aflatoxine-like dans le tapioca (215), interférence dans les extraits de beurre de cacahuète (211), interférence par l'éthoxyquine (231) et mauvaise identification de l'aflatoxine M₁ (232)), ces techniques de spectroscopie de masse sont importantes du fait de leur degré de spécificité mais sont très coûteuses. Au bureau des denrées alimentaires (faisant partie du FDA), une technique de spectroscopie de masse, basée sur l'ionisation chimique d'ion négatif, s'est développée pour confirmer l'identité des aflatoxines B₁ et M₁ (233).

3.1.3. - Méthodes biologiques^a de confirmation des aflatoxines

Depuis le premier test biologique réalisé sur des canetons d'un jour (234), d'autres essais se sont développés, utilisant divers systèmes incluant des oeufs de poulet, des oeufs de mollusques, des crevettes d'eau de mer, des cellules HeLa, le *Bacillus megaterium*, des jeunes feuilles de maïs, des larves de poissons Zebra, le *Bacillus subtilis*.

Il est important de réaliser qu'aucune de ces méthodes biologiques ne peut confirmer l'identité des aflatoxines, mais plutôt la présence d'une toxine.

Les méthodes biologiques sur canetons (234) et sur embryons de poulets (235) sont les plus utilisées, car elles débouchent sur le type de

lésion attendue et par conséquent, sont plus spécifiques que les méthodes biologiques basées sur la mortalité.

Les méthodes biologiques, basées sur l'inhibition de la croissance de bactéries, ont l'avantage d'être rapides et simples par rapport aux autres méthodes. Un des microorganismes les plus utilisés est *Bacillus megaterium* (196). Les principales méthodes biologiques sont résumées dans le tableau suivant.

Principales techniques biologiques pour la confirmation des aflatoxines.

Organismes	Quantité d'échant. requis	Temps requis	Observations	Rf.
Caneton	10 µg	7 jours	Prolifération du canal biliaire	234
Oeuf de poule	> 0,05 µg	21 jours	Mort de l'embryon	235
Oeufs de mollusque	> 0,05 µg	18 heures	Inhibition de la division cellulaire	236
Crevette d'eau de mer	0,5 µg/0,5 ml	24 heures	Mort de la crevette	237
Cellules HeLa	5 - 7 µg/ml	30 heures	Inhibition de la croissance	238
<i>Bacillus megaterium</i>	1 µg	15 heures	Inhibition de la croissance	196
Jeunes feuilles de maïs	0,25 µg	19 heures	Inhibition de la croissance	239
Larve de poisson Zebra	0,4 µg	24-25 heures	Mort de la larve	240
<i>Bacillus subtilis</i>	1 µmole	12 heures	Mort de la cellule	240

3.2. - Les ochratoxines et autres mycotoxines

3.2.1. - Les ochratoxines

Usuellement, les méthodes de confirmation des ochratoxines sont les techniques de chromatographie en couche mince sur gel de silice avec détection visuelle ou par fluorodensitométrie, ceci par rapport à un témoin standard d'ochratoxine. A ce sujet, Durackova a fait l'étude des ochratoxines A, B et C par TLC dans 8 systèmes de solvants différents, avec détection chimique (FeCl_3) et détection sous U.V. (366 nm) après la détection chimique (227).

Diverses méthodes biologiques pour la confirmation des ochratoxines A et B ont été proposées et sont résumées dans le tableau suivant.

Techniques biologiques de confirmation des ochratoxines A et B.

Ochratoxines	Organismes	Sensibilité	Rf.
A et B	<i>Bacillus cereus mycoides</i>	1,5 µg d'ochratoxine A	241
A	Oeufs de poule de 6 jours	DL ₅₀ < 0,01 µg en utilisant la cellule d'air pour injecter l'ochratoxine A	242
A	Larve de crevette de mer	CL ₅₀ = 10,1 µg/ml	243
A	Larve de poisson Zebra	CL ₅₀ = 1,7 µg/ml	240
A	Cellules HeLa	10 - 32 µg/ml	244

3.2.2. - La zéaralénone

Les propriétés physiques et chimiques de la zéaralénone sont utilisées pour la confirmation de cette toxine, en spectroscopie I.R. du fait que la zéaralénone donne un spectre bien particulier (245), et en chromatographie en couche mince où elle est détectée chimiquement, et aussi par U.V. (227).

3.2.3. - Les trichothécènes

Les analyses chimiques des trichothécènes sont difficiles du fait que ces toxines n'ont pas de propriétés fluorescentes, et n'absorbent pas d'une manière appréciable en lumière U.V.. La visualisation de ces toxines après séparation par TLC se fait en pulvérisant H_2SO_4 ou le mélange H_2SO_4 -p.anisaldéhyde (cf. chap. 4, sect. 1.4.).

A ce sujet, Durackova et al. (227) ont analysé sur TLC les toxines suivantes : toxine T-2, trichothécine, Nivalénol, Diacétoxyscirpénol. La détection se fait par voie chimique en pulvérisant le mélange H_2SO_4 -p.anisaldéhyde et aussi sous U.V. après la pulvérisation chimique. Du fait de leur toxicité dermique, un test biologique, "Skin Test", a été élaboré. Il consiste en l'application de la toxine extraite dans de l'acétate d'éthyle sur la peau rasée d'un jeune lapin. On note alors les réactions dermiques (érythème, oedème, nécrose) après 24, 48 et 72 heures. Le degré de la réaction est obtenu par comparaison à une gamme de réponses obtenue avec la toxine T-2 standard. Cette méthode est sûre et sensible jusqu'à 0,01 μg /test ou 50 ppb (246).

IV - METHODES DE DOSAGE DES MYCOTOXINES

Des procédés biologiques et chimiques ont été établis pour la détection et le dosage des mycotoxines. Les techniques d'épreuve biologique actuelles ne conviennent pas pour le criblage de routine et n'assurent pas un seuil de détection assez bas. Quant aux techniques d'épreuve chimique, elles sont précises et plus rapides, mais ne sont pas toujours spécifiques.

Un des problèmes qui se pose pour le dosage concerne l'échantillonnage. Il est indispensable que l'échantillon soit représentatif du lot dont il provient. La difficulté de l'échantillonnage des mycotoxines, surtout les aflatoxines, tient à l'hétérogénéité de leur distribution dans les denrées contaminées non traitées. Le chapitre 26 des "Official methods of analysis" de l'Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (247) traite de quelques aspects pratiques de l'échantillonnage.

4.1. - Méthodes de dosage des aflatoxines

4.1.1. - Méthodes chimiques

Bien que les modalités de l'analyse varient beaucoup, les étapes fondamentales en sont immuables : extraction, délipidation, épuration, séparation et dosage.

Nombre de méthodes analytiques applicables au dosage des aflatoxines dans les denrées alimentaires de l'homme et des animaux ont été signalées. Beaucoup d'entre elles n'apportent aux étapes fondamentales que des modifications mineures qui les adaptent à l'étude de substances particulières ou visent à résoudre des problèmes spéciaux.

Deux des méthodes les plus courantes actuellement sont la méthode de la "Contamination Branch" (CB) et la méthode dite "Best Foods" (BF), applicables aux cacahuètes (247).

La méthode C.B. consiste à épuiser l'échantillon avec de l'eau qui est ensuite extraite par le chloroforme ; les lipides et les aflatoxines sont transférés sur une colonne de gel de silice où les lipides sont sélectivement élués à l'hexane, tandis que les pigments et autres substances gênantes le sont à l'éther sulfurique absolu ; finalement, les aflatoxines sont éluées de la colonne au moyen d'une solution à 3 % de méthanol dans le chloroforme.

La méthode C.B. étant assez longue et coûteuse, on s'est efforcé à la simplifier ce qui a donné naissance à la méthode dite "Best Foods" où l'étape de purification ne se fait plus par passage de l'extrait sur colonne de gel de silice, mais par décantation et où la centrifugation remplace l'étape de filtration. Par cette méthode, l'échantillon est d'abord épuisé et délipidé en milieu biphasique, méthanol aqueux-hexane. Après centrifugation, les aflatoxines sont extraites de la phase aqueuse par le chloroforme, cependant que les lipides et les pigments restent dans l'hexane et le méthanol aqueux.

Bien que la méthode B.F. soit plus rapide et économique, elle ne permet pas une aussi bonne épuration que la méthode C.B. Que ce soit par la méthode C.B. ou B.F., les aflatoxines sont concentrées par évaporation du chloroforme, et finalement séparées par chromatographie en couche mince (TLC).

Outre ces procédures applicables aux cacahuètes, des méthodes d'analyse ont été établies pour l'expertise du coprah, des graines de co-

tonnier, du maïs, de diverses noix et amandes et des aliments pour animaux. Beaucoup de ces méthodes sont des variantes des méthodes C.B. et B.F. Le dosage des aflatoxines M_1 et M_2 dans le lait et les produits laitiers demande des méthodes beaucoup plus fines car ces métabolites d'origine animale se trouvent usuellement à des concentrations inférieures à 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$. L'obtention de résultats satisfaisants exige une épuration supplémentaire pour éliminer les substances et, parfois, l'application de techniques TLC bidimensionnelles (3).

4.1.1.1. - La chromatographie en couche mince (TLC)

La méthode de chromatographie en couche mince est la plus usuelle ; elle est de plus peu coûteuse et facile par rapport à d'autres techniques. Le chapitre 26 des "Official methods of analysis" (AOAC) décrit les méthodes officielles de TLC (247).

Dans une publication récente, Issaq et Cutchin (248) ont comparé la séparation des aflatoxines B_1 , B_2 , G_1 , G_2 , sur six plaques commercialisées de gel de silice dans douze systèmes de solvants. Deux des systèmes de solvants, chloroforme : acétone : hydroxyde d'ammonium (90:10:0,25) et chloroforme : acétone : hexane (85:15:20) résolvent les quatre aflatoxines sur toutes les plaques testées.

Le tableau suivant donne pour chaque plaque testée, le système de solvants donnant la meilleure résolution de quatre aflatoxines, B_1 , B_2 , G_1 et G_2 .

Plaque	Système de solvants
Gel de silice 60 (0,25 mm)	Chloroforme : Acétone : Héxane (85:15:20)
K5F (0,25 mm)	Toluène : Acétate d'éthyle : Acide formique (6:3:1) ou Chloroforme : Acétone : Héxane (85:15:20)
HPTLC (0,20 mm)	Chloroforme : Acide acétique : Ether (17:1:3)
Gel de silice 25 HR (0,25 mm)	Chloroforme : Acétone : Hydroxyde d'ammonium (90:10:0,25)
Adsorbisil I (0,25 mm)	Chloroforme : Tétrahydrofuran (90:10)
Gel de silice IBF (0,20 mm)	Chloroforme : Acétone : Héxane (85:15:20)

Les systèmes de solvants les plus utilisés pour le développement des plaques de TLC sont cités dans le tableau suivant (ces systèmes ne sont pas équilibrés sauf ceux qui sont spécifiés) (249).

Système de solvants	Vol./Vol.
Chloroforme : Acétone	9 : 1
Benzène : Méthanol : Acide acétique	90 : 5 : 5
Ether : Méthanol : Eau	96 : 3 : 1
Dichlorométhane : Trichloroéthylène : Alcool N amylique : Acide formique (l'ordre des Rf change : B ₁ , G ₁ , B ₂ , G ₂)	80 : 15 : 4 : 1 (Equilibré)
Chloroforme : Trichloroéthylène : Alcool N amylique : Acide formique	80 : 15 : 4 : 1
Chloroforme : Acétone : Eau	88 : 12 : 1,5
Chloroforme : Acétone : Isopropanol : Eau	88 : 12 : 1,5 : 1
Chloroforme : Isopropanol	99 : 1
Benzène : Ethanol : Eau	46 : 35 : 19
Chloroforme : Méthanol	95 : 5 (Equilibré)

La fluorescence en U.V. des aflatoxines après séparation par TLC, permet de les doser par comparaison avec une gamme étalon. Mais le coefficient de variation de cette technique est assez élevé, de l'ordre de 20 %. L'usage d'un fluorodensimètre permet de l'abaisser à une valeur comprise entre 5 et 9 % (3).

La limite de sensibilité de la méthode C.B. est de 10 µg/kg pour les aflatoxines B₁ et G₁, bien que des valeurs plus basses aient été rapportées. La récupération des aflatoxines B₁ et G₁ d'échantillons à 15 et 10 µg/kg est de 70 %. Pour la méthode B.F., la sensibilité va jusqu'à 3 µg/kg d'aflatoxine B₁. La récupération d'aflatoxines dans l'échantillon se fait à 91 % pour la B₁, 83 % pour la B₂, 92 % pour la G₁ et 84 % pour la G₂ (249). Pour un dosage plus précis et plus sensible, on peut éluer les taches correspondant aux aflatoxines de la plaque chromatographique et doser par spectrofluorimétrie en se basant sur une gamme étalon de l'aflatoxine à doser.

4.1.1.2. - La chromatographie en couche mince bidimensionnelle

La TLC bidimensionnelle a été utilisée avec succès dans les cas où un nombre important de substances gênantes sont présentes dans l'extrait. L'utilisation de l'éther, soit dans une ou dans les deux dimensions a été montrée pour déplacer ces substances gênantes jusqu'au front du solvant avant le développement de la plaque TLC par le solvant principal. Les systèmes de solvants utilisés sont les suivants :

- (1) Chloroforme : Acétone (9:1) et (2) Toluène : Acétate d'éthyle : Acide formique à 90 % (5:4:1)

- (1) Toluène : Acétate d'éthyle : Acide formique à 90 % (5:4:1) et
(2) Chloroforme : Acétone (9:1)
- (1) Diéthyléther anhydre et (2) Chloroforme : Trichloroéthylène : Tert-
butanol : Acide formique (85:10:4:1)
- (1) Diéthyléther : Méthanol : Eau (94:4,5:1,5) et (2) Chloroforme : Acétone
(9:1)
- (1) Diéthyléther : Méthanol : Eau (94:4,5:1,5) et (2) Chloroforme : Acé-
tone : Méthanol (90:10:2)
- (1) Benzène : Méthanol : Acide acétique (90:5:5) et (2) Chloroforme :
Acétone (9:1).

Le dosage des aflatoxines se fait par spectrofluorimètre par rapport à une gamme étalon (250).

4.1.1.3. - Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

Depuis une dizaine d'années, une nouvelle technique de dosage des aflatoxines est apparue, nommée chromatographie liquide à haute pression (HPLC). Les premiers travaux utilisant cette nouvelle technique furent réalisés par Manabe et Matsuura (250). Ils obtinrent une résolution partielle des aflatoxines à partir d'un mélange en utilisant comme phase stationnaire, une colonne Sephadex G10 (CM) et comme phase mobile de l'eau pure. Les aflatoxines furent éluées dans cet ordre : G_{2a} , B_{2a} , G_2 , B_2 , G_1 , B_1 . Cette méthode de dosage a été améliorée au cours d'années de recherche, et le tableau suivant donne quelques exemples d'utilisation de l'HPLC pour le dosage des aflatoxines à partir d'échantillons contaminés.

En comparaison avec la chromatographie en couche mince, la méthode HPLC donne une meilleure résolution des aflatoxines, et de ce fait, il y a augmentation de la spécificité.

Du fait de l'automatisation d'une large partie de l'analyse, à partir de l'injection de l'échantillon dans l'appareil jusqu'au résultat final, cette méthode a l'avantage d'une simplicité opérationnelle. Toutefois, la méthode HPLC est fort coûteuse par rapport à la TLC, ne permettant pas actuellement qu'elle soit une méthode de routine pour le dosage des aflatoxines dans les denrées contaminées. De récentes méthodes de dosage, peu utilisées actuellement, sont étudiées pour l'analyse des aflatoxines. Ce sont la chromatographie en couche mince à haute ^{performance} pression (HPTLC) et la chromatographie en phase gazeuse (GLC).

Echantillons	Appareillage HPLC	Détecteur	Remarques	Limites de détection	Rf.
Haricots cuits Noix Breakfast à base de céréales Viande	Phase stationnaire : colonne de gel de silice, Lichrosorb SI 60 (5 µm), phase mobile : chloroforme saturé avec de l'eau (10 parties) et de l'acide acétique glacé (1 partie) phase mobile pour l'aflatoxine M ₁ : chloroforme : acide acétique : méthanol (50:5:3)	Spectrofluorimètre	Avant passage sur HPLC, séparation par TLC (chloroforme : acétone : acide acéti- que, 88:12:1)	En µg/kg Afl. B ₁ : 2,5 Afl. B ₂ : 2,5 Afl. G ₁ : 0,3 Afl. G ₂ : 0,4 Afl. M ₁ : 0,6	251
	Phase stationnaire : colonne de gel de silice Partisil-5 (6 µm) phase mobile : 0,3 % v/v méthanol dans de l'eau saturée au dichloro- méthane	Spectrophotomètre	Méthode applicable pour le dosage des aflatoxines dans la nourriture	Afl. B ₁ : 10 ng dans 1 µg d'échant.	252
Denrées alimen- taires	Phase stationnaire : colonne de gel de silice AB-5 phase mobile : toluène : acétate d'éthyle : acide formique : méthanol (178:15:4:3)	Spectrofluorimètre	Précision quantitati- ve de HPLC supérieure à celle de TLC	Afl. B ₁ : à partir de 10 ppb (0,5 ng) jusqu'à 4 ppm (200 ng)	253
Cacahuètes décor- tiquées non grillées	Phase stationnaire : colonne de gel de silice µ-Bondapak C ₁₈ (10 µm) phase mobile : eau : méthanol (60:40)	a) Détecteur de fluorescence b) Détecteur U.V.	Bonne concordance des résultats donnés par les deux détecteurs pour les afl. B ₁ et B ₂ , un peu moins pour les afl. G ₁ et G ₂	La limite de détec- tion est meilleure avec le détecteur de fluorescence Afl. B ₁ : 0,5 ng Afl. B ₂ : 0,05 ng Afl. G ₁ : 0,5 ng Afl. G ₂ : 0,05 ng	254

4.1.2. - Méthodes biologiques

Les techniques d'épreuve biologique actuelles ne conviennent pas pour le criblage de routine et n'assurent pas un seuil de détection assez bas (3). De plus, ces méthodes ne sont que semi-quantitatives. Les services officiels de contrôle recourent couramment à l'épreuve sur embryon de poulet. Une droite dose-réponse est tracée en utilisant de l'aflatoxine B₁ standard. Cette méthode consiste à appliquer 0,1 à 0,2 µg d'aflatoxine B₁ sur la membrane de l'eau et à relever le taux de mortalité durant les 23 jours de couaison (247). Plusieurs autres procédés biologiques ont été mis au point qui demandent l'utilisation de jeunes plants de maïs, de larves de poisson Zebra, de crevettes d'eau de mer, de bactéries, etc... (cf. chap. 4, sect. 3.1.3.).

4.2. - Méthodes de dosage des ochratoxines

4.2.1. - Méthodes chimiques

4.2.1.1. - La chromatographie en couche mince (TLC)

La chromatographie en couche mince est la méthode de dosage des ochratoxines la plus usuelle. Nesheim et al. (255) a passé en revue les diverses méthodes de dosage des ochratoxines dans les denrées alimentaires. La méthode la plus souvent utilisée, en particulier pour les céréales, com-

porte a) une extraction par un mélange de chloroforme et d'acide phosphorique dilué, b) une épuration sur une colonne d'hydrogène carbonate aqueux imprégnant de la terre de diatomées, et c) un dosage par chromatographie en couche mince, par spectrofluorimétrie, en comparaison avec une gamme étalon. La sensibilité est de l'ordre de quelques $\mu\text{g}/\text{kg}$ (256).

Les plaques de TLC usuellement utilisées sont : SilicAR TLC-7G, Adsorbisil-1, Silica-gel G-HR (257). Les systèmes de solvants utilisés pour la séparation de l'ochratoxine A et B sur TLC sont les suivants :

Benzène : Acide acétique (3 : 1)

Toluène : Acétate d'éthyle : Acide formique (5 : 4 : 1)

Benzène : Méthanol : Acide acétique (24 : 2 : 1 ou 90 : 5 : 5).

Bien que ces systèmes de solvants permettent une bonne séparation des ochratoxines A et B, l'imprégnation du gel de silice avec de l'acide oxalique et le développement de la plaque chromatographique avec un système neutre de solvants, chloroforme : isopropyl acétone (4 : 1) offrent une excellente séparation de ces deux toxines (258).

4.2.1.2. - Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

Cette méthode est peu utilisée pour le dosage des ochratoxines. Hunt et al. (251) ont proposé une méthode de dosage par HPLC des aflatoxines et de l'ochratoxine A ayant contaminés diverses denrées alimentaires, la phase stationnaire étant une colonne de gel de silice Lichrosorb SI 60 ($5 \mu\text{m}$) et la phase mobile, du chloroforme saturé avec de l'eau (10 parties) et de l'acide acétique glacé (1 partie). La limite de détection de l'ochratoxine sur 50 grammes d'échantillon est de $12,5 \mu\text{g}/\text{kg}$.

4.3. - Méthodes de dosage de la zéaralénone

4.3.1. - Méthodes chimiques

Une méthode de détection multiple des aflatoxines, des ochratoxines et de la zéaralénone a été mise au point et éprouvée collectivement (3). Le mode opératoire consiste à extraire les composés au moyen d'un mélange eau-chloroforme et à éluer séquentiellement les mycotoxines dans une colonne de gel de silice ; la sensibilité est de l'ordre de 50 à $100 \mu\text{g}/\text{kg}$.

Mirocha et al. (259) ont décrit un procédé de détection de la zéaralénone, dont l'application est très souple, faisant appel à la chromatographie en couche mince (TLC), à la chromatographie gaz-liquide (GLC),

à la chromatographie gaz-liquide associée à la spectrométrie de masse, ou à une combinaison de toutes ces techniques ; la sensibilité est voisine de 50 µg/kg.

4.3.1.1. - La chromatographie en couche mince (TLC)

Le développement de la plaque TLC pour la détection de la zéaralénone se fait avec le système de solvants, chloroforme : méthanol (97:3). La tache de zéaralénone sur la plaque est rendue visible par pulvérisation d'acide sulfurique à 50 % dans du méthanol suivie par un chauffage de la plaque à 120°C pendant 10 à 20 minutes. La zéaralénone apparaît en un spot de couleur jaune à brun.

On peut aussi pulvériser sur la plaque une solution de ferricyanure de potassium-chlorure ferrique (1 : 1) suivie par une pulvérisation d'acide hydrochlorique, 2N. La zéaralénone apparaît en un spot bleu intense (245). La limite de détection de la zéaralénone sur plaque TLC est de 0,1 µg et la sensibilité de la méthode est de 50 ppb.

4.3.1.2. - La chromatographie gaz-liquide (GLC)

La zéaralénone est convertie quantitativement en dérivé triméthylsilylé (TMS-éther) qui est un dérivé volatil adéquat pour l'analyse par GLC. Une quantité aussi faible que 50 ng de zéaralénone peut être détectée par cette méthode. La sensibilité de la chromatographie gaz-liquide pour la zéaralénone est de 50 ppb (245). La combinaison chromatographie gaz - spectrométrie de masse (GC-MS) n'est qu'une méthode d'analyse permettant la détection et la confirmation par le spectre de masse du dérivé TMS-éther de la zéaralénone.

4.3.1.3. - Dosage par ultra-violet (UV)

Pour le dosage en UV, la zéaralénone doit tout d'abord être séparée par TLC de ses dérivés, F-5-3 et F-5-4. Ces dérivés ont des Rf différents de celui de la zéaralénone mais ont un spectre UV identique à celui de la zéaralénone. La zéaralénone est éluée de la plaque TLC avec de l'acétone. Après évaporation de l'acétone, le résidu est repris par de l'éthanol à 95 %, pour le dosage en UV à 274 nm. Les limites de détection se situent entre 0,1 et 0,5 µg/ml (245).

4.3.1.4. - La chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

On dispose actuellement de deux méthodes d'analyse par chromatographie liquide à haute performance qui permettent de déceler la zéaralénone au taux de 5 µg/kg dans des flacons de maïs (95, 98).

4.4. - Méthodes de dosage des trichothécènes

4.4.1. - Méthodes chimiques

Les analyses chimiques des trichothécènes sont difficiles car ce groupe n'a pas de propriétés fluorescentes et n'absorbe pas d'une manière appréciable dans l'UV.

Les trichothécènes sont généralement extraits de l'échantillon avec de l'acétate d'éthyle ou du chloroforme. Toutefois, des solvants plus pôlaires (par exemple, méthanol aqueux à 40 %) sont requis pour l'extraction du nivalénol, de la fusarénone X et du déoxynivalénol.

L'extrait est usuellement associé avec des substances pigmentées et des lipides qui interfèrent lors de l'analyse. Après purification par l'utilisation d'un milieu biphasique, acétonitrile-éther de pétrole, l'extrait des trichothécènes est prêt pour l'analyse chromatographique (157).

4.4.1.1. - La chromatographie en couche mince (TLC)

La visualisation des trichothécènes après séparation sur TLC est faite par pulvérisation avec H_2SO_4 ou avec une combinaison de H_2SO_4 et de paraanisaldéhyde (cf. chap. 4, sect. 1.4.) et permet donc la détection et la quantification des trichothécènes par spectrophotométrie, mais souvent cette analyse est rendue difficile par la présence de pigments et le dosage n'est pas précis (157). Pour recourir à ce problème, la séparation des trichothécènes par TLC suivie par le dosage par chromatographie gaz-liquide (GLC) est recommandée.

4.4.1.2. - La chromatographie gaz-liquide (GLC)

Tous les trichothécènes, à l'exception des verrucarines et des roridines, peuvent être chromatographiés en utilisant leurs dérivés volatils acétate ou triméthylsilylé éther.

La sensibilité de l'analyse par GLC est de loin meilleure que celle par TLC. Mais l'analyse par GLC a l'inconvénient d'une mauvaise identification du fait de nombreux composés ayant un temps de rétention identique ou similaire à ceux des trichothécènes. Toutefois, la séparation par TLC suivie par l'analyse en GLC résoud ce problème : les trichothécènes suspects peuvent être élués du gel de silice après séparation sur TLC, pour l'identification et le dosage par GLC (157).

CONCLUSION

Le développement de techniques plus précises et plus spécifiques d'identification, de dosage et de confirmation des mycotoxines ont permis une meilleure analyse de ces toxines dans les denrées alimentaires contaminées. La chromatographie en couche mince (TLC) reste, actuellement, la méthode la plus usuelle pour l'identification et le dosage des mycotoxines. Cependant, il semble que les méthodes de chromatographie liquide à haute performance soient en voie de devenir prochainement les procédés de choix pour l'analyse des mycotoxines en raison tant de leur précision et de leur sensibilité que de leur applicabilité à l'étude de nombreuses mycotoxines, dont les aflatoxines B₁, B₂, G₁ et G₂. Il est important de pouvoir doser correctement ces mycotoxines lorsqu'elles se trouvent à de faibles concentrations dans certaines denrées alimentaires, du fait que ces faibles doses de toxines suffisent pour induire chez l'animal des effets toxiques aigus mais aussi chroniques.

CHAPITRE V

-:-:-:-:-

EFFETS DES MYCOTOXINES CHEZ L'HOMME ET CHEZ L'ANIMAL

INTRODUCTION

Depuis la découverte des aflatoxines mises en cause dans la maladie X des dindons, début 1960, les recherches se sont orientées, en particulier, sur les effets des mycotoxines chez divers animaux lors d'intoxications naturelles, mais surtout lors d'expériences au laboratoire. Ces études ont permis de mieux comprendre les effets des mycotoxines au niveau biochimique, de connaître les doses susceptibles de déclencher une intoxication aiguë ou chronique chez telle espèce animale, mais aussi de faire des rapprochements avec certaines toxicoses humaines où des mycotoxines, en particulier les aflatoxines, semblent jouer un rôle étiologique.

I - LES AFLATOXINES1.1. - Les effets des aflatoxines chez l'animal

Les symptômes d'intoxication par les aflatoxines ont été étudiés, soit lors d'intoxications naturelles, soit en laboratoire à la suite de l'ingestion d'aliments contaminés par des aflatoxines.

1.1.1. - Intoxications naturelles
.....

La première observation d'aflatoxicose fut réalisée lors d'une épidémie aiguë en Angleterre qui fit périr plus de 100 000 dindonneaux, en 1960, épidémie ayant pour cause la contamination par des aflatoxines de tourteaux à base de farine de noix du Brésil (taux d'aflatoxine B₁ ≈ 10 mg/kg). La maladie était caractérisée par une dégradation rapide de l'état de santé, des hémorragies sous-cutanées et la mort des volailles. A l'autopsie, on découvrit un foie pâle, gras, une nécrose hépatique étendue et une prolifération de l'épithélium des canaux biliaires (3).

D'autres observations furent faites lors d'intoxications d'animaux

(porcs, chiens, veaux, canetons) par ingestion d'aliments contaminés, débouchant sur le fait que les lésions hépatiques analogues à celles de la maladie des dindonneaux, sont la caractéristique majeure des aflatoxicoses (3).

1.1.2. - Etudes expérimentales chez l'animal

En ce qui concerne les aflatoxines animales, la nature des phénomènes pathologiques dus à l'ingestion d'aflatoxines varie en fonction de l'espèce animale, de la dose et de la durée d'administration. On peut ainsi classer les manifestations pathologiques en deux types d'intoxication, l'intoxication aiguë et l'intoxication chronique, le foie étant le principal organe-cible dans les deux types d'intoxication. La relation entre la structure chimique des différentes aflatoxines et leur activité biologique a été étudiée expérimentalement et ces études ont conclu que les aflatoxines B₂ et G₂ étaient moins toxiques que B₁ et G₁, B₁ étant de loin l'aflatoxine la plus toxique.

1.1.2.1. - L'intoxication aiguë

Les différentes espèces animales ne sont pas toutes également sujettes à l'intoxication aiguë par l'aflatoxine B₁ ; pour la voie orale, la DL₅₀ va de 0,3 à 17,9 mg/kg p.c. (0,3 pour le lapin et 17,9 pour la rate) (3). Chez les mammifères, les espèces qui présentent le plus facilement des phénomènes d'intoxication aiguë sont le lapin, le chien, le cobaye (260).

L'intoxication aiguë se traduit par la mort des animaux dans les délais variant selon la sensibilité spécifique. Dans chacun des cas, l'hépatotoxicité des aflatoxines se manifeste : on trouve une nécrose hépatique avec dégénérescence graisseuse et prolifération des cellules biliaires.

Mais le foie n'est pas le seul organe touché lors d'expériences de toxicité aiguë pratiquées avec de fortes doses d'aflatoxines. L'administration par gavage à des rats des deux sexes, de doses uniques d'aflatoxine B₁, de 7,2 mg/kg p.c. pour les rats et de 17,9 mg/kg p.c. pour les rates, est mortelle. On note, au cours des premiers jours qui suivent l'administration, de fréquentes hémorragies surrenaliennes bilatérales, des pétéchies au niveau de nombreux organes, notamment dans les poumons congestionnés et, parfois, des nécroses en foyers dans le myocarde, les reins et la rate (3, 261). De même, de semblables manifestations pathologiques ont été observées chez des cobayes, 2 à 3 jours après une injection intra-péritonéale unique d'aflatoxine B₁ à la dose de 1,4 mg/kg p.c. (= DL₅₀) (3).

1.1.2.2. - L'intoxication chronique

Les troubles liés à l'intoxication chronique due à l'ingestion de rations faiblement contaminées pendant plusieurs semaines ou plusieurs mois, sont d'un tout autre ordre que ceux liés à l'intoxication aiguë. Les premiers symptômes visibles consistent en une anorexie et un ralentissement de la croissance, voire même une perte de poids ; mais, rapidement, c'est le foie qui souffre le plus de l'activité toxique. On observe le développement de carcinomes hépatiques, ou quelquefois de cirrhoses : par exemple, l'administration prolongée (14 mois) d'un aliment faiblement contaminé (0,03 ppm) provoque chez le canard le développement de carcinomes hépatiques (260).

Le rat est un animal de laboratoire intéressant du fait que cette espèce permet de mettre facilement en évidence le pouvoir cancérigène des aflatoxines. Sur la base de divers résultats expérimentaux, on estime que la dose d'aflatoxine B₁ capable d'induire le développement de carcinome hépatique chez le rat est de l'ordre de 10 ppm/animal/jour (11). Signalons enfin que la truite arc-en-ciel est l'une des espèces les plus sensibles aux effets hépato-carcinogènes des aflatoxines (11).

1.1.2.2.1. Cancérogénicité

Administrées par voie orale, les aflatoxines, principalement la B₁, se sont montrées hépatocancérogènes chez toutes les espèces animales d'épreuve (y compris des primates autres que l'homme) étudiées jusqu'ici, à l'exception de la souris chez laquelle seule l'injection i.p. de B₁ à des nouveaux-nés a eu des effets cancérigènes. Ces travaux ont porté sur l'exposition à long et à court terme aux aflatoxines. Les tableaux suivants résument ces résultats de laboratoire (3).

Hépatocancérogénicité de l'aflatoxine B₁ chez les rongeurs.

Espèces	Taux de dose	Durée du régime	Période d'observation	Incidence des tumeurs hépatiques
Rat, Fisher	1,0 mg/kg alim.	33 semaines	52 semaines	3/6
Rat, Fisher	1,0 mg/kg alim.	41-64 semaines	41-64 semaines	18/21
Rat, Porton	1,0 mg/kg alim.	20 semaines	90 semaines	19/20
Rat, Wistar	1,0 mg/kg alim.	21 semaines	87 semaines	12/14
Souris, Swiss	150 mg/kg alim.*	80 semaines	80 semaines	0/60
Souris, C57B1/6NB	1,0 mg/kg alim.	80 semaines	80 semaines	0/30
Souris, C3HFB/HEN	1,0 mg/kg alim.	80 semaines	80 semaines	0/30
Souriceau, hybride F ₁ de 4 jours	6,0 µg/g p.c.	3 doses (i.p.)	80 semaines	16/16

* Administration d'un mélange d'aflatoxines B₁ et G₁.

Espèces	Dose ou Taux de dose	Durée du traitement	Période d'observation	Incidence tumorale au niveau du foie
Singe, rhésus (M)	1,655 g total ^b	5,5 ans	8,0 ans	1/1
Singe, rhésus (F)	1,655 g total	5,5 ans	10,75 ans	1/1
Singe, rhésus (F)	0,504 g total	6,0 ans	8,0 ans	1/1
Ouistiti	3,0 mg total	50-55 semaines	50-55 semaines	1/3
	5,04-5,84 mg total ^c	87-94 semaines	87-94 semaines	2/3
Tupaja (M et F)	24-66 mg total	74-172 semaines	74-172 semaines	9/12
Furet	0,3-2,0 µg/kg	28-37 mois	28-37 mois	7/9
Canard	30 µg/kg	14 mois	14 mois	8/11
Truite arc-en-ciel	4 µg/kg alim.	12 mois	12 mois	15 %
	8 µg/kg alim.	12 mois	12 mois	40 %
Truite arc-en-ciel embryons	0,5 mg/kg eau	1 heure	296-321 jours	38 %
Saumon	12 µg/kg alim. ^d	20 mois	20 mois	50 %
Vairon	6 mg/kg alim.	11 mois	11 jours	7/11

b - Administration d'un mélange d'aflatoxines B₁ et G₁.

c - Infection expérimentale simultanée par le virus de l'hépatite.

d - Régime additionné entre autre d'acides gras cyclopropénoïdes à raison de 50 mg/kg alim.

Ayant étudié la relation entre la structure chimique des différentes aflatoxines et leur hépatocancérogénicité chez le rat Fisher mâle, Wogan et al. (262) concluent que l'aflatoxine B₁ est plus cancérogène que la G₁ et que toutes les deux le sont davantage que la B₂.

Le potentiel carcinogène de l'aflatoxine M₁ a été étudié chez la truite arc-en-ciel et les expériences ont montré qu'elle a une activité tumorale au niveau hépatique 3 fois moindre que celle de l'aflatoxine B₁ (cf. Chap. 5, Sect. 1.1.2.2.2., Tableau : Corrélations entre la mutagénicité des aflatoxines *in vitro* chez *S. typhimurium* et leur cancérogénicité *in vivo* chez l'animal).

En dehors des tumeurs hépatiques, il est apparu occasionnellement des tumeurs chez des animaux de laboratoire à la suite de traitement aux aflatoxines per os : cancer du côlon chez des rats, adénocarcinomes gastriques, tumeurs des glandes lacrymales, épithéliomas spinocellulaires de la langue et de l'oesophage (3).

1.1.2.2.2. Mutagénicité

Le potentiel mutagène des aflatoxines et de leurs dérivés a été recherché par Wong et Hsieh (263) d'après le test d'Ames (264), système de mutations

réverses de souches de *Salmonella typhimurium* histidine dépendantes. Ils ont ainsi pû donner, par ordre décroissant, le potentiel mutagène des aflatoxines et de leurs dérivés.

Potentiel mutagène des diverses aflatoxines par ordre décroissant.

Aflatoxine	B ₁	Aflatoxicol	G ₁	M ₁	H ₁	Q ₁	B ₂	P ₁	G ₂	B _{2a}	G _{2a}
Potentiel mutagène	1,000	0,228	0,033	0,032	0,020	0,012	0,002	0,001	0,001	0,001	0,000

* Les valeurs données sont relatives au potentiel mutagène de l'aflatoxine B₁.

Selon le test d'Ames, l'aflatoxine B₁ a été trouvée comme étant la plus mutagène des quatres aflatoxines contaminants naturels tandis que l'aflatoxine G₁ est moins mutagène. Les aflatoxines B₂ et G₂ sont estimées non toxiques. Parmi les métabolites de l'aflatoxine B₁ formés chez l'animal, l'aflatoxicol est celui qui possède la plus grande activité mutagène, suivie par les aflatoxines M₁, H₁, Q₁. Les toxines P₁ et B_{2a} se sont révélées non mutagènes. La comparaison de ces résultats avec ceux d'expériences animales sur la carcinogénicité des aflatoxines *in vivo*, a montré une remarquable corrélation (Tableau suivant).

Corrélation entre la mutagénicité des aflatoxines *in vivo* chez *S. typhimurium* et leur cancérogénicité *in vivo* chez l'animal.

Aflatoxines	Mutagénicité relative (%)*	Carcinogénicité
Aflatoxine B ₁	100	Le plus puissant hépatocarcinogène chez le rat Le plus puissant hépatocarcinogène chez la truite arc-en-ciel
Aflatoxicol	22,8	A une activité tumorale chez la truite arc-en-ciel de moitié moindre par rapport à l'aflatoxine B ₁
Aflatoxine G ₁	3,3	Moins tumorigène chez le rat que l'aflatoxine B ₁ moins hépatocarcinogène chez la truite arc-en-ciel que l'aflatoxine B ₁
Aflatoxine M ₁	3,2	Possède une activité tumorale chez la truite arc-en-ciel 3 fois moindre par rapport à l'aflatoxine B ₁ moins tumorigène chez le rat que l'aflatoxine B ₁
Aflatoxine H ₁	2,0	
Aflatoxine Q ₁	1,1	Non tumorigène chez la truite arc-en-ciel
Aflatoxine B ₂	0,2	Trouvée inactive chez le rat faible activité chez le rat à la dose de 150 fois celle de l'aflatoxine B ₁ faible activité chez la truite arc-en-ciel
Aflatoxine P ₁	0,1	
Aflatoxine G ₂	0,1	Trouvée inactive chez la truite arc-en-ciel
Aflatoxine B _{2a}	0,00	
Aflatoxine G _{2a}	0,00	

* Mutagénicité relative par rapport à l'aflatoxine B₁.

D'autres études sur l'effet mutagène de l'aflatoxine B₁ ont été réalisées sur des chromosomes humains. Les cellules traitées ont révélé un

taux élevé d'aberrations chromosomiques, surtout des cassures et des échanges. Ces travaux ont abouti sur le fait que la distribution des points de cassure sur les chromosomes n'est pas due au hasard. Quelques chromosomes sont très sensibles à l'effet mutagène de l'aflatoxine B₁ (par exemple, les chromosomes 2, 11, 19 et 20) tandis que d'autres chromosomes sont très résistants (par exemple, les chromosomes 22, X et Y) (265).

1.1.2.2.3. Tératogénicité

Le tableau suivant résume quelques expériences de tératogénicité faites au laboratoire sur certaines espèces animales. D'après ces expériences, l'aflatoxine B₁ montre un effet tératogène, se traduisant par des résorptions et des malformations foetales.

Effets tératogènes de l'aflatoxine B₁ sur certaines espèces animales.

Espèces expérimentées	Dose d'aflatoxine B ₁	Effets constatés	Rf.
Embryons de poulet	1/100 ppm	Augmentation de la mortalité foetale allant de 6,6 à 35 % pour la dose de 100 ppm. Augmentation de la mortalité foetale allant jusqu'à 26 % pour la dose de 150 ppm. Plusieurs malformations ont été observées : spina bifida, pattes déformées, éviscération. Le groupe ayant reçu 1/100 ppm d'aflatoxine B ₁ montre aussi des retards de croissance des ailes, pattes, maxillaire et mandibule.	266
	1/150 ppm		
Rates gestantes	1/100 ppm durant les 14 premiers jours de la gestation	Résorptions, malformations et retards du développement embryonnaire ont été observés. Chez les rates gestantes, des lésions hépatiques ont été observées.	267
Hamsters gestantes	4 ou 6 mg/kg (i.p.) au jour 8 et 9 de la gestation	Les observations ont été faites le 11 ^{ème} et le 15 ^{ème} jour de la gestation : l'effet principal observé est un retard de la croissance foetale. Des nécroses hépatiques et rénales sont présentes chez les femelles gestantes.	268

1.1.3. - Effets biochimiques et mode d'action des aflatoxines

De toutes les aflatoxines, l'aflatoxine B₁ est la plus toxique et notre étude se limite aux effets biochimiques de cette toxine et son action cellulaire. Il semble bien que l'aflatoxine B₁ soit métaboliquement activée avant d'exercer ses effets aigus et chroniques (cf. Chap. 3, Sect. 1.3.). L'interaction du dérivé métaboliquement activé de l'aflatoxine B₁ avec les hépatocytes conduit à de nombreux effets :

a) Blocage de la synthèse des ARN par inhibition de l'ARN polymérase ADN dépendante

La transcription est particulièrement touchée par l'aflatoxine B₁. En effet,

5 minutes après administration de 1 mg/kg d'aflatoxine B₁ au rat, l'incorporation d'¹⁴C-| acide orotique dans les ARN nucléaires est inhibée de 70 % par rapport à celle trouvée chez les témoins. Toutes les catégories d'ARN cellulaires sont touchées par la toxine. Cependant, la transcription de gènes correspondant aux ARN ribosomiens est tout particulièrement affectée par l'inhibition. Le blocage de synthèse se maintient à un niveau de 80 % jusqu'à 20 heures après l'injection pour ensuite diminuer progressivement. L'inhibition observée correspond réellement à une altération du système de transcription comme le prouvent les inhibitions de l'activité des ARN polymérase des noyaux isolés à partir du foie de rats traités *in vivo* par l'aflatoxine. Quelle que soit la force ionique du milieu, on observe toujours une très forte diminution de la capacité de synthèse d'ARN *in vitro*, ce qui montre que les deux systèmes enzymatiques de transcription localisés, l'un dans le nucléole, l'autre dans le nucléoplasme sont touchés par la toxine (269).

Sur le plan du mécanisme moléculaire de l'inhibition, les métabolites dérivés de l'aflatoxine B₁ bloquent la transcription en agissant au niveau de l'enzyme elle-même (l'ARN polymérase ADN dépendante). En ce qui concerne l'étape de la transcription touchée, il a été montré que c'est au niveau de l'initiation de la chaîne polynucléotidique que s'exerce l'action inhibitrice de l'aflatoxine (269, 270).

b) Inhibition de la synthèse de l'ADN par liaison covalente avec celui-ci.

Des études récentes ont montré une attaque préférentielle de l'aflatoxine B₁ au niveau de l'ADN mitochondrial. L'action inhibitrice importante de la transcription et de la translation mitochondriale, ainsi que l'attaque préférentielle de l'aflatoxine B₁ sur l'ADN mitochondrial, laisse supposer que le système génétique mitochondrial est une des cibles directes de l'aflatoxine B₁ au cours de ces expériences (271, 272).

c) Inhibition de la synthèse des protéines par action directe sur la traduction en empêchant la terminaison des chaînes polypeptidiques (3, 273).

d) Action sur la perméabilité cellulaire et sur les systèmes transporteurs d'électrons.

L'aflatoxine agit sur la perméabilité cellulaire qu'elle augmente en particulier au niveau des mitochondries, et le transport des électrons est interrompu, conduisant à un déclin de la respiration cellulaire (3), le site d'action semblerait se localiser entre le cytochrome b et le cytochrome c ou c₁ (273). Obidao, Onyechi et al., lors d'un travail récent *in vitro* sur des mi-

tochondries hépatiques de rat, supposent que l'action inhibitrice des aflatoxines B₁ et G₁ sur le transfert d'électrons, celle de G₁ étant plus puissante, peut se faire au niveau de 3 sites possibles : succinate deshydrogénase, ATPase et la réaction entre le complexe respiratoire I et l'intermédiaire non phosphorylé hautement énergétique (274).

Les membranes lysosomiales deviennent elles aussi perméables, conduisant à une fuite des hydrolases acides non liées. Il se pourrait que l'activation des enzymes lysosomiales et leurs effets sur les structures cellulaires fassent partie d'un mécanisme d'action toxique des aflatoxines (3, 273).

e) Action toxique au niveau du réticulum endoplasmique de l'hépatocyte. L'aflatoxine réagit avec le réticulum endoplasmique, causant une dégranulation précoce. Cette dégranulation a lieu dans la région périportale du foie, zone au niveau de laquelle une nécrose peut éventuellement apparaître. De plus, au niveau du réticulum endoplasmique, une désagrégation des profils polyribosomiaux est constatée avec constitution de formes polyribosomiales hélicoïdales (3, 273).

L'aflatoxine B₁ non métabolisée, interfère dans le réticulum auprès des sites de liaison ribosomiaux qui sont usuellement occupés par les hormones stéroïdes génitales (estradiol chez les mâles, testostérone chez les femelles) et il s'en suit une concurrence entre l'aflatoxine B₁ et les hormones stéroïdes au niveau de ces sites de liaison (3, 273). Ceci reflète bien les similarités structurales entre l'aflatoxine et la structure des hormones stéroïdes.

f) Autres actions cellulaires de l'aflatoxine. L'aflatoxine B₁ inhibe de nombreuses fonctions métaboliques, y compris la synthèse des protéines, l'induction enzymatique et la synthèse des facteurs II et VII de la coagulation sanguine.

La transformation métabolique du glucose par l'intermédiaire du glucose-6-phosphate et la synthèse des acides gras et des phospholipides sont également ralenties. De plus, on constate la disparition du contrôle en retour de la synthèse du cholestérol, ce qui est considéré comme caractéristique de l'état précancéreux. Dans le cytoplasme hépatique se produit une stimulation transitoire suivie d'une dépression de la glycogénolyse et du métabolisme du glucose par la déviation pentosique (3). L'aflatoxine B₁ a des propriétés immuno-dépressives, probablement apparentées à son effet inhibiteur sur la synthèse des protéines (3, 275, 276).

Ainsi, la nécrose hépatocellulaire aiguë semble résulter de l'interaction des aflatoxines en divers sites intracellulaires alors que la mutagénicité et la cancérogénicité de ces toxines sont probablement subordonnées à l'activation métabolique d'un agent alkylant l'ADN vraisemblablement l'époxyde-2,3 (cf. Chap. 3, Sect. 1.3.).

En ce qui concerne la cancérogénicité et la mutagénicité induites par les aflatoxines, de nombreuses expériences où l'ADN est mis en contact avec le métabolite actif de l'aflatoxine, ont été réalisées. De tels systèmes fonctionnent grâce à l'adjonction de microsomes hépatiques apportant les enzymes de conversion des drogues ("drogues" étant le terme pris dans le sens de "substances étrangères au métabolisme normal").

La fixation de l'aflatoxine à l'ADN provoque des altérations de la capacité de modèle de celui-ci. Ces altérations peuvent entraîner ultérieurement l'introduction d'erreurs dues à un mauvais positionnement des bases dans l'ADN synthétisé au cours de la replication suivante : il en résulte des modifications de la séquence des nucléotides de l'ADN, c'est à dire l'apparition de mutation. Or, il a été démontré l'existence d'une corrélation hautement positive entre le pouvoir cancérogène et le pouvoir mutagène.

L'hypothèse la plus vraisemblable expliquant la mutagénèse due à l'aflatoxine est la suivante : On sait que l'ADN lésé peut être réparé, il existe différents systèmes enzymatiques (les réparases) qui ont pour fonction d'effacer les anomalies présentes et de redonner à l'ADN son intégrité structurale initiale. Toutefois, si certains de ces systèmes effectuent correctement la réparation (réparation fidèle), d'autres introduisent des erreurs au cours de leur travail (réparation infidèle) ; la mutagénèse qui en résulte n'est donc pas liée directement à l'interaction de la substance chimique avec l'ADN mais à un effet secondaire résultant d'une réparation erronée de l'ADN.

Ce système de réparation infidèle est connu sous le nom de système SOS. Il a été montré au cours d'expériences sur des bactéries que les métabolites actifs de l'aflatoxine B₁ étaient capables de déclencher le signal de la dérégulation du système SOS dans la bactérie, donc d'induire la synthèse d'enzymes de réparation entraînant une mutagénèse au cours de leur travail (277).

Ainsi, si l'on admet que la cancérisation d'une cellule tient son origine d'une mutation spécifique qui va s'exprimer dans le clone constitué par les générations successives de cellules par l'apparition d'une tumeur

maligne, on peut considérer que les propriétés mutagènes de l'aflatoxine B₁ pourraient rendre compte de ses propriétés cancérigènes (277).

1.2. - Les effets des aflatoxines chez l'homme

1.2.1. - Cancérogénèse hépatique

Des recherches épidémiologiques ont été réalisées, dues à la fréquence particulière des cancers primitifs du foie chez des populations d'Afrique, d'Asie ou d'Inde dont l'alimentation est souvent contaminée par *Aspergillus flavus* en raison des conditions d'exposition ou de stockage. Ces études ont révélé une corrélation positive entre l'ingestion de denrées alimentaires contaminées par les aflatoxines et le cancer primitif du foie chez l'homme. Le tableau suivant résume ces études menées dans certains pays (278).

Cancer du foie, taux d'incidence et enregistrement des données des différentes études.

Pays (région)	Cancer du foie		Durée de l'étude (en années)	Population
	Nombre de cas enregistrés	Incidence annuelle /10 ⁵ hab.		
Kenya (Haute altit.)	4	1,23	7	46 279
Thaïlande (Songkhla)	2	2,00	1	97 867
Swaziland (Haute veld)	11	2,18	5	100 719
Kenya (Alt. moyenne)	33	2,51	7	187 514
Swaziland (Veld moyen)	29	3,83	5	151 430
Kenya (Faible alt.)	49	4,01	7	174 525
Swaziland (Lebombo)	4	4,27	5	18 747
Thaïlande (Ratburi)	6	6,00	1	99 537
Swaziland (Veld infér.)	42	9,18	5	91 471
Mozambique (Inhambane)	?	25,4	3	?

Le tableau suivant récapitule l'incidence du cancer primitif du foie chez l'homme dans certains pays par rapport au nombre total de malignités trouvées à l'autopsie. Les résultats soulignent bien que les Philippines est un des pays qui a une forte proportion de cancers primitifs du foie (276).

La présence d'aflatoxine B₁ a été également détectée dans des prélèvements de cancers primitifs du foie développés chez des habitants du Zaïre (279) et aussi chez un homme âgé, aux Etats-Unis, ayant un carcinome du rectum, du foie avec nécrose extensive du tissu hépatique (280).

Incidence à l'autopsie du cancer primitif du foie dans certains pays.

Pays	Nombre d'autopsies	% de cancers primitifs du foie par rapport au nombre total de tumeurs malignes
Philippines	29 765	22
Afrique :		
Bantou	8 068	50,9
Lagos	2 000	23,2
Chine	3 498	18,9
Danemark	14 881	2,9
Inde	3 528	11,3
Japon	6 429	6,9
Mexique	6 558	2,0
Singapour	9 893	17,8
Suède	8 837	3,3
U.S.A. (Los Angeles)	35 293	1,4

1.2.2. - Syndrome de Reye

Ce syndrome, décrit pour la première fois par Reye, Morgan et Barral (281), est une encéphalopathie avec dégénérescence graisseuse des viscères. Il commence généralement par des symptômes respiratoires bénins et des vomissements imprévus qui surviennent de quelques heures à plusieurs jours après les premiers signes de la maladie. Ces vomissements sont immédiatement accompagnés par des signes de dysfonctionnement cérébral. La mortalité est de 80 à 85 % et touche souvent les enfants.

Les altérations morphologiques sont une transformation graisseuse diffuse et une stéatose des organes parenchymaux, un oedème cérébral et, souvent, une hyperplasie du système lymphatique. Le rétablissement de l'encéphalopathie, généralement, survient rapidement et les enfants qui se rétablissent, souvent, semblent très tranquilles 10 jours plus tard. Dans certains cas, après le rétablissement, des désordres neurologiques plus ou moins sérieux sont observés et lors de cas sporadiques, une lésion hépatique aiguë conduisant plus tard à une cirrhose.

Des recherches, depuis de nombreuses années, ont été entreprises afin de connaître l'étiologie de cette maladie ; la possibilité que certains cas du syndrome de Reye soient dus à l'ingestion d'aflatoxines a été suggérée du fait que des traces d'aflatoxines ont été décelées dans certains tissus de malades ayant succombé à ce syndrome (3, 281). Dvorackova et al. ont exa-

miné 27 enfants décédés du syndrome de Reye, âgés de 3 jours à 8 ans. De l'aflatoxine B₁ a été décelée dans le foie de tous ces cas et de l'aflatoxine M₁ dans 4 cas. Il a été suggéré que la contamination du lait en poudre par de l'aflatoxine B₁ dans les locaux domestiques était responsable de l'exposition dans 5 des 27 cas. Par contre, aucune trace d'aflatoxine M₁ n'a été détectée dans ce lait (282).

Du fait qu'aucune trace d'aflatoxines n'a été détectée dans de nombreux cas de syndrome de Reye, on ne peut que suggérer que les aflatoxines jouent un rôle important dans l'étiologie de ce syndrome, étiologie probablement variée.

1.2.3. - Autres hépatopathies

Le tableau suivant résume les cas d'hépatopathies, autre que le cancer du foie et le syndrome de Reye, observés dans certaines parties du monde. Les aflatoxines décelées dans l'alimentation des malades atteints d'hépatopathie, jouent un rôle important dans l'étiologie de ces d'affections, mais il est difficile d'établir une relation de cause à effet (3).

Rapports d'hépatopathies (abstraction faite du syndrome de Reye et du cancer) chez des sujets exposés aux aflatoxines dans leur alimentation.

Pays	Nombre de cas d'hépatopathie	Groupe d'âge	Véhicule présumé des aflatoxines	Concentration d'aflatoxines estimée (mg/kg)	Nature et issue de l'hépatopathie	Rf.
Sénégal	2	4-6 ans	Farine de cacahuètes	0,5 - 1	Hépatite suivie de fibrose dans un cas	3
Chine (province de Taïwan)	26	Tout âge	Riz	0,2	Hépatite aigüe, mortelle chez 3 enfants	3
Ouganda	1	15 ans	Manioc	1,7	Hépatite aigüe mortelle	3
Inde	20	1,5-15 ans	Farine de cacahuètes	0,3	Hépatomégalie. Défaillance hépatique : mortelle dans 3 cas. Cirrhose ultérieure dans certains cas (Cirrhose juvénile)	3
Inde	Plusieurs centaines	Nourrissons indemmes	Maïs	0,25 - 15	Hépatite toxique aigüe : plus de 100 morts	3
Kenya	20		Maïs	12	Hépatite, mortelle pour 12 malades. 2 familles d'où provenaient 8 des 12 malades décédés, mangeaient du maïs contenant jusqu'à 12 mg/kg d'aflatoxine B ₁ . Le tissu hépatique de ces malades contenait jusqu'à 89 ppb d'aflatoxine B ₁	283

1.2.4. - Autres affections

La présence d'aflatoxine B₁ a été démontrée dans deux cas de cancer pulmonaire par TLC et microscopie fluorescente. On a supposé que l'aflatoxine B₁ avait une implication dans ces deux cas de cancer pulmonaire (284).

Dvorackova (285) a signalé que deux hommes ayant fait un travail concernant la stérilisation de farine de noix du Brésil contaminée par *A. flavus*, avaient succombé à une adénomatose pulmonaire. Des échantillons pulmonaires prélevés sur l'un d'eux ont été analysés et la présence d'aflatoxine B₁ a été suggérée.

II - LES OCHRATOXINES

2.1. - Les effets des ochratoxines chez l'animal

2.1.1. - Intoxications naturelles

Depuis la découverte de la néphropathie porcine mycotoxique par Larsen en 1928, cette maladie fut régulièrement observée dans d'autres pays, tels que la Norvège, la Suède l'Islande (6). De vastes études étiologiques ont révélé que l'ochratoxine A joue un rôle dans la néphropathie porcine. Les reins des porcs touchés par cette maladie, sont particulièrement gros et pâles. Les altérations morphologiques observées dans les reins provenant de cas de néphropathie porcine sont caractérisées par une dégénérescence des tubes contournés proximaux, suivie d'une atrophie de l'épithélium tubulaire, d'une fibrose interstitielle dans le cortex rénal et d'une hyalinisation de quelques glomérules (3).

Les observations concernant la néphropathie mycotoxique n'ont pas été seulement réalisées auprès des porcs mais aussi auprès de volailles (3, 6). Les lésions rénales chez les volailles sont assez communément rencontrées au cours des inspections à l'abattoir des volailles. Dans une étude (92) des lésions rénales des volailles observées durant les inspections, il a été démontré que 27 % des cas correspondaient en fait à une néphropathie associée à l'ochratoxine A. Les modifications de la structure rénale comprennent une augmentation de volume et un changement de couleur. Sur le plan microscopique, les lésions sont caractérisées par une dégénérescence de l'épithélium du tube rénal qui se manifeste par des tubes dilatés, le gonflement et la desquamation des cellules épithéliales. Ces changements sont accompagnés par la formation de tissu conjonctif interstitiel. Dans les tissus musculaires de tous les oiseaux souffrant de néphropathie, des concentrations d'ochratoxine A allant jusqu'à 29 ppb ont été détectées, indiquant une ingestion préalable d'aliments contaminés par l'ochratoxine A.

2.1.2. - Etudes expérimentales chez l'animal

Au cours des études expérimentales sur des animaux, les effets aigus et chroniques des ochratoxines ont été examinés. Ces études ont montré que

l'ochratoxine A est la plus toxique du groupe des ochratoxines, l'ochratoxine B l'étant à un degré moindre.

2.1.2.1. - L'intoxication aiguë

La sensibilité animale à l'intoxication aiguë par l'ochratoxine A varie selon l'espèce animale éprouvée, la DL_{50} étant comprise entre 3,4 ou 30,3 mg/kg (3,4 pour le poulet et 30,3 pour le rat). La rate est plus sensible que le mâle à l'ochratoxine administrée per os (3).

Les lésions observées se concentrent principalement au niveau du rein et sont identiques à celles observées au cours d'intoxications naturelles. Chez certains animaux de laboratoire, comme chez le rat après administration quotidienne d'ochratoxine A pendant 10 jours, des effets hépatotoxiques ont été décelés : on a constaté au niveau du foie une congestion active siégeant dans le secteur artériel porte et dans les sinusoides ; les hépatocytes présentaient des images de dégénérescence cytoplasmique (vacuolation lipidique) et nucléaire (pycnose) (80).

En plus des effets hépatotoxiques, des effets congestifs et hémorragiques ont été notés. Fortement congestionné, l'appareil digestif présente le plus souvent une gastrite hémorragique et ulcéralive. L'observation des autres segments du tube digestif montre des entérites avec hyperproduction de mucus et des typhites hémorragiques ; par ailleurs, les formations lymphoïdes et le ganglion mésentérique apparaissent hypertrophiés et congestifs. Un retard de croissance a été constaté chez ces rats intoxiqués sûrement lié à l'effet congestif et hémorragique au niveau du tractus gastro-intestinal (80).

2.1.2.2. - L'intoxication chronique

L'intoxication chronique provoquée par l'ingestion d'ochratoxine A à faible dose pendant un temps long, a débouché sur une néphropathie mycotoxique chez les animaux de laboratoire. Par exemple, la néphropathie aviaire constatée lors d'intoxications naturelles a été reproduite au laboratoire sur des poules et des poulets exposés pendant un an à des taux de 0,3 à 1 mg/kg alimentaire. Les modifications structurales des reins observées dans la maladie spontanée ont été retrouvées lors de l'expérimentation, à l'exception de la formation de tissus conjonctifs interstitiels (3, 6).

2.1.2.2.1. Effets tératogène et embryotoxique de l'ochratoxine A

Ces effets furent étudiés sur des embryons de poulets (286) sur des souris gestantes, des rates gestantes (3, 80, 287). Lors d'expériences sur embryon

de poulet (286) où est injecté par voie sous-cutanée ou intra-amniotique, de l'ochratoxine A et de la citrinine (la citrinine étant produite avec l'ochratoxine A par certaines souches d'*Aspergillus* et de *Penicillium*), la dose minimale conduisant à des effets embryo-toxiques fut évaluée : 0,01 à 0,05 µg pour l'ochratoxine A et 1 à 10 µg pour la citrinine.

En plus du retard important du développement des foetus, diverses malformations foetales furent relevées le 8ème jour d'incubation : exencéphalie, malformations faciales, cardiaques, intestinales, malformations des membres avec réduction. Les auteurs de cette étude sur embryons de poulet, en additionnant constamment 4 µg de citrinine à l'ochratoxine A administrée à la dose comprise entre 0,03 µg et 0,5 µg constatèrent un effet strictement additif. Il supposèrent donc que la citrinine produite avec l'ochratoxine A par certaines souches de *Penicillium viridicatum* Westling ne potentialise pas l'action embryotoxique de l'ochratoxine A. Tous ces effets tératogènes conduisant à un accroissement de la mortalité prénatale, furent aussi constatés lors d'études sur rates et souris gestantes (3, 80, 287).

2.1.2.2.2. Mutagénicité et Cancérogénicité de l'ochratoxine A

A l'heure actuelle, on manque de données sur la mutagénicité des ochratoxines et leur cancérogénicité, rendant impossible l'évaluation de tels risques.

2.1.3. - Les effets biochimiques de l'ochratoxine A

Les études expérimentales n'ont pas débouché sur des conclusions identiques en ce qui concerne l'action du métabolisme des glucides. Certains auteurs ont constaté une accumulation de glycogène hépatique chez le rat, d'autres l'inverse. En tout cas, il est prouvé que l'ochratoxine A entraîne une perturbation importante du métabolisme des glucides chez le rat (3, 80, 288).

En ce qui concerne l'accumulation de glycogène hépatique chez le rat, il a été envisagé que l'ochratoxine agirait par compétition avec l'AMP 3',5' cyclique qui active la phosphorylase kinase responsable de la transformation du glycogène en glucose 1-P (80).

Par contre, l'hypothèse proposée pour la diminution de la concentration du glycogène hépatique constatée au cours d'expériences sur le rat, se base sur l'inhibition de l'alimentation du foie en glucose, l'interruption de la synthèse du glucogène à partir du glucose et l'accélération de la décomposition du glycogène. Une autre hypothèse sur l'action de l'ochratoxine confirmée par

les études faites *in vitro* sur les mitochondries hépatiques du rat, par Meisner et Chan (289), soutient que l'ochratoxine A comme son métabolite, l'ochratoxine α inhibent la respiration mitochondriale en jouant le rôle d'un inhibiteur compétitif des protéines transporteuses situées dans la membrane mitochondriale interne. La poursuite d'expériences avec des préparations mitochondriales ont révélé que la fixation de l'ochratoxine A par les mitochondries était un processus consommateur d'énergie qui conduisait à une déplétion en adénosine-triphosphate (ATP) intra mitochondrial, et que l'ochratoxine A inhibait le transport du phosphate intramitochondrial, d'où résultait une détérioration de la mitochondrie (3).

En conclusion, sur les effets biochimiques de l'ochratoxine A, il semble bien que l'action de l'ochratoxine A siège au moins en partie au niveau des mitochondries dont on connaît l'importance pour la vie de la cellule. Une forte perturbation du métabolisme des glucides a été relevée dans les effets biochimiques de cette toxine, mais, étant donné les observations contradictoires faites à ce sujet, il demeure encore à prouver ces hypothèses par des recherches complémentaires en pharmacologie cellulaire, voire moléculaire.

2.2. - Les effets des ochratoxines chez l'homme

La néphropathie balkanique endémique est une affection rénale qui n'a été trouvée que parmi les populations rurales vivant à proximité du Danube, en Yougoslavie, en Roumanie et en Bulgarie.

Cette maladie chronique touche le plus souvent les sujets de 30 à 50 ans d'âge et évolue lentement vers la mort. La taille des reins est notablement réduite. Histologiquement, l'affection rénale est caractérisée par une dégénérescence des tubes contournés, une fibrose du tissu interstitiel et une hyalinisation des glomérules dans la partie la plus superficielle du cortex (290).

Du fait de similitudes frappantes entre les altérations de la structure et de la fonction rénale observées, d'une part, dans la néphropathie endémique balkanique et d'autre part, dans la néphropathie porcine due à l'ochratoxine A, il semblerait que la néphropathie balkanique ait pour étiologie l'ingestion d'aliments contaminés par l'ochratoxine A. En effet, des études faites en Yougoslavie ont montré la présence à un taux élevé d'ochratoxine A dans des denrées alimentaires, dans une région où la prévalence de la néphropathie endémique humaine est élevée et, ceci, par rapport à des ré-

gions témoins (84). Toutefois, l'hypothèse selon laquelle cette toxine pourrait être un agent étiologique de cette maladie demande confirmation.

Aucune information concernant des maladies humaines, autre que la néphropathie endémique balkanique, dans lesquelles l'ochratoxine A pourrait être impliquée, n'a été signalée.

III - LA ZEARALENONE

3.1. - Les effets de la zéaralénone chez l'animal

3.1.1. - Intoxications naturelles

Les intoxications dues à la zéaralénone ont surtout été observées chez les truies, mais aussi chez les porcs et certaines volailles (1).

La zéaralénone chez les truies, conduit à un syndrome oestrogénique qui touche principalement le système génital. Ce syndrome se manifeste par une hypertrophie considérable de la vulve, avec prolapsus du vagin, et secondairement du rectum, les jeunes femelles ont une vulve oedémateuse, les glandes mammaires sont gonflées. Chez les mâles, on a constaté soit un gonflement plus ou moins prononcé du prépuce, parfois suffisamment sévère pour gêner l'émission d'urine, soit des désordres mammaires (1, 183).

De tels désordres ont été constatés chez d'autres animaux de ferme, entraînant souvent avortement et stérilité. Des dindons et mêmes des oies ont également été intoxiqués (1).

3.1.2. - Etudes expérimentales chez l'animal

Le syndrome oestrogénique a été reproduit expérimentalement chez la truie en lui administrant une dose journalière de 5 mg de zéaralénone pendant 6 semaines. En quelques jours, une hypertrophie vulvaire et mammaire et un prolapsus vaginal apparaissent. Ces effets sont réversibles par interruption de l'exposition (3). Les troubles de la fécondité observés lors d'une intoxication naturelle de bétail ont été confirmés expérimentalement.

Des études expérimentales sur la tératogénèse de la zéaralénone sur des rates gestantes ont été faites et seule une étude a permis de déceler des anomalies squelettiques foetales (l'incidence des anomalies étant de 12,8 %) après administration quotidienne, per os, d'une dose de 1 mg/kg p.c. pendant toute la durée de gestation des rates (3).

3.1.3. - Les effets biochimiques de la zéaralénone

Peu de temps après l'administration de zéaralénone, on constate une

augmentation marquée de la perméabilité cellulaire au glucose et à l'uridine, suivie par une augmentation de la synthèse macromoléculaire au niveau du tissu utérin. Ces résultats indiquent que la zéaralénone présente une activité oestrogénique similaire à celle du 17- β -oestradiol, malgré sa structure non stéroïdique. Lors de l'analyse du mécanisme moléculaire de l'action de la zéaralénone, les recherches se sont portées sur l'interaction entre la zéaralénone et la réception oestrogénique *in vitro*, et la modification biochimique de la chromatine utérine *in vivo*. Il a été trouvé que la zéaralénone se lie au récepteur utérin du cytosol et que ce récepteur oestrogénique transmet l'effet jusqu'au noyau de la cellule utérine, effet suivi par l'induction de protéines oestrogéniques spécifiques (IP) et d'ARN polymérase. Il est significatif que la double liaison C-1'=C-2' et le résidu hydroxy au carbone C-6' (cf. Chap. 3, Sect. 3.2.) augmentent l'affinité des dérivés de la zéaralénone pour le récepteur utérin du cytosol. En effet, l'affinité du zéaralénol est plus élevée que celle de la zéaralénone, les dérivés α -hydroxylés étant plus actifs que les dérivés β -hydroxylés (169).

3.2. - Les effets de la zéaralénone chez l'homme

A l'heure actuelle, aucune intoxication chez l'homme due à la zéaralénone n'a été rapportée, bien que des denrées destinées à l'alimentation humaine aient été découvertes contaminées par la zéaralénone, parfois à des taux élevés (cf. Chap. 1, Sect. 3.1.2.). Mais à long terme, l'exposition à de telles denrées contaminées pourraient présenter un risque pour la santé humaine.

IV - LES TRICHOHECENES

4.1. - Les effets des trichothécènes chez l'animal

4.1.1. - Intoxications naturelles

Les observations faites à ce sujet sont peu nombreuses et laissent supposer la responsabilité de certains trichothécènes ayant contaminés des denrées pour bétail, dans l'intoxication de certains animaux de ferme. C'est le cas d'un troupeau laitier où 1/5 des bêtes sont mortes. Les lésions observées chez ces animaux comprenaient de vastes plages hémorragiques sur la surface séneuse de toutes les viscères. La toxine T-2 a été décelée à un taux voisin de 2 mg/kg de poids sec dans la nourriture de ce bétail, à base de maïs moisi (100). Il a été suggéré qu'une intoxication, qui a touché des volailles (canards, oies), des chevaux et des porcs, pourraient avoir été associée à la consommation d'orge moisi contaminé par la toxine T-2 au taux d'environ 25 mg/kg. Outre des troubles digestifs, des lésions sont apparues chez les oies :

une nécrose des muqueuses de l'oesophage du proventricule et du gosier fut constatée (101). Le tableau suivant résume les diverses toxicoses pour lesquelles sont concernées les trichothécènes, affectant certains animaux.

Résumé des toxicoses chez les animaux dues aux trichothécènes.

Toxicose	Pays et espèces affectées	Espèces fongiques responsables	Symptômes généraux
Toxicose "Taumelgetreide"	Sibérie : cheval, cochon, volaille	<i>Gibberella saubinetii</i>	Maux de tête, coups de froid, nausées, vomissements
Toxicose "Red-mold"	Japon : cheval, cochon, vache	<i>Fusarium graminearum</i>	Vomissements, hémorragies au niveau des poumons, des capsules surrénales et des intestins, refus de nourriture
Toxicose "Moldy corn"	USA : cochon, vache	<i>Fusarium tricinctum</i>	Vomissements, refus de nourriture
Aleucie toxique alimentaire (A.T.A.)	URSS : animaux domestiques	<i>Fusarium poae</i> <i>Fusarium sporotrichioides</i>	Vomissements, lésions nécrotiques de la cavité buccale, de l'oesophage et de l'estomac, leucopénie accusée
Stachybotryotoxigène	URSS : cheval	<i>Stachybotrys atra</i>	Choc, stomatite, nécrose dermique, leucopénie
Toxicose "Bean-Hulls"	Japon : cheval	<i>Fusarium solani</i> , etc...	Convulsions, mouvements cycliques
Dendrochiotoxigène	URSS : mouton, cochon	<i>Dendrochium toxicum</i>	Inflammation, hémorragies

4.1.2. - Etudes expérimentales chez l'animal

Les études faites sur divers animaux de laboratoire, des effets aigus des trichothécènes exprimés en DL₅₀ sont résumés dans le tableau suivant (3).

Toxicité aigüe des trichothécènes contaminants naturels

Composés	DL ₅₀ (mg/kg p.c.)	Voie d'administration	Animal
Toxine T-2	3,04	Intrapéritonéale	Souris
Toxine T-2	3,8	Per os	Rat
Toxine T-2	6,1	Per os	Truite
Toxine T-2	5,25	Per os	Poulet de 1 jour
Nivalénoï	4,0	Intrapéritonéale	Souris
Diacétoxyscirpénol	10,0	Intraveineuse	Souris
Diacétoxyscirpénol	0,75	Intrapéritonéale	Rat
Diacétoxyscirpénol	7,3	Per os	Rat

Les effets toxiques des trichothécènes ont été étudiés par administration de ces toxines par voie générale (per os, intrapéritonéale ou intraveineuse) mais aussi par application locale.

Les trichothécènes, lorsqu'ils sont appliqués sur la peau rasée de rat ou de lapin, causent une réaction dermatologique importante. Cette réaction est caractérisée par une sévère irritation locale, une inflammation, une desquamation, une hémorragie subépidermique et une nécrose générale.

Lorsqu'ils sont donnés oralement ou par injection intrapéritonéale, les trichothécènes sont fortement toxiques à basses concentrations (cf. tableau). Après administration per os, les animaux testés deviennent opathiques ou inactifs et développent des diarrhées et des hémorragies rectales. Des lésions nécrotiques peuvent se développer dans les zones buccales. On constate une érosion de l'épithélium de l'estomac et de l'intestin grêle, accompagnée par une hémorragie qui peut se développer en une sévère gastroentérite, conduisant à la mort. Les cellules de la moelle osseuse, des noyaux lymphatiques et des intestins subissent une dégénération pathologique. Pour de nombreux animaux testés, des hémorragies importantes se sont développées dans la lumière de l'intestin grêle (291).

Des études de toxicité des trichothécènes au cours de la gestation de souris ont été réalisées par Stanford et al. (292). Injectée par la voie i.p. à des souris gestantes, l'un des jours 7 à 11 de la gestation, la toxine T-2, aux doses de 1,0 ou de 1,5 mg/kg p.c., a provoqué la mort de plusieurs animaux et a augmenté la mortalité prénatale. On a observé des malformations foetales (notamment de la queue et des membres), de l'exencéphalie et un retard de la formation des maxillaires.

4.1.3. - Effets biochimiques des trichothécènes

Les approches biochimiques sur le mode d'action des trichothécènes, révèlent que ces toxines sont des inhibiteurs puissants de la synthèse des protéines et de l'ADN dans les cellules eucaryotes. En effet, les trichothécènes induisent des dommages cellulaires caractérisés par une caryorrhixis, et une destruction des cellules à division rapide du thymus, des testicules, des intestins, de la rate et autres organes chez les animaux testés. L'inhibition puissante de la synthèse des protéines et de l'ADN a été observée chez les réticulocytes de lapin, chez les cellules tumorales d'Ehrlich, chez les protozoaires et chez les bactéries (8, 157).

Un effet précoce des trichothécènes sur les cellules animales est la désagrégation de la structure polysomale. Ce phénomène est induit par un contact bref de la cellule avec la toxine et n'est pas réversible lors d'une incubation ultérieure des cellules en l'absence de la toxine. Les expériences avec la toxine T-2 et la fusarénone marquées ont révélé que ces toxines se

lient aux polysomes et au ribosomes des cellules eucaryotiques. Cette affinité, envers les cellules animales, est attribuée à leur affinité envers les ribosomes 80 S. La liaison des trichothécènes dépend de la structure des ribosomes. La liaison la plus forte a été observée avec les microsomes, suivie par celle avec les polysomes actifs et les ribosomes. Par contre, aucune liaison détectable n'a été observée avec les sous-unités des ribosomes. Les trichothécènes inhibent la polymérisation peptidique. En effet, ils interfèrent avec le centre actif de la transférase peptidique du ribosome et empêchent le cycle ribosomal causant l'inhibition des réactions d'initiation et de terminaison. D'autres expériences ont démontré la liaison de la trichodermine avec les polysomes et l'inhibition consécutive de la synthèse peptidique.

En ce qui concerne l'inhibition de la synthèse de l'ADN par les trichothécènes, l'explication biochimique n'est pas encore claire. Ueno a prouvé que ces toxines ne causent pas d'inhibition de la thymidine kinase et de l'ADN polymérase, dans les cellules tumorales. L'élévation de la concentration de TDP et de TTP et l'accumulation de petits morceaux d'ADN observées dans les cellules traitées suggèrent une interférence de la réaction de la ligase *in vivo* (8).

En ce qui concerne la synthèse de l'ARN, les trichothécènes, tels que la toxine T-2, le nivalénol et la fusarénone ne montrent aucun effet inhibiteur, au cours d'expériences sur des cellules tumorales, des cultures de cellules et des protozoaires. Des approches expérimentales récentes indiquent que les trichothécènes n'inhibent ni la synthèse nucléaire de l'ARN, ni l'ARN polymérase ADN dépendante dans le foie de rat (8).

4.1.4.- Mutagénicité des trichothécènes

Le seul résultat positif d'expériences de mutagénicité avec les trichothécènes a été observé en utilisant des cellules de levure. En exposant ces cellules au nivalénol et à la fusarénone, des mutants "déficients respiratoires" ont été induits (8). La mutagénicité des trichothécènes demande à être étudiée en détail.

4.2. - Les effets des trichothécènes chez l'homme

Diverses toxicoses, pour lesquelles les trichothécènes sont grandement suspectées, ont touché l'homme, à la suite de l'ingestion de denrées alimentaires à base de céréales contaminées par certaines espèces fongiques. Le tableau suivant résume ces toxicoses.

La toxicose la plus importante qui toucha l'homme fut l'aleucie to-

xique alimentaire (A.T.A.) qui sévit dans certaines républiques d'URSS durant les années 1942 à 1947. Cette maladie, fatale dans de nombreux cas, se caractérisait par une leucopénie sévère, des hémorragies multiples, une agranulocytose, une septicémie et un épuisement de la moelle osseuse. La mortalité due à l'A.T.A. a été maximale pour la tranche d'âges comprise entre 8 et 50 ans et a touché jusqu'à 60 % des personnes intoxiquées (291). Des études étiologiques ont été réalisées afin de connaître l'agent responsable de cette maladie. Les résultats ont montré que les principaux facteurs de cette toxicose étaient deux souches fongiques, *Fusarium poae* et *Fusarium sporotrichioides*. Ces moisissures ont contaminé essentiellement le millet, mais aussi le blé, le seigle, l'avoine et le blé mûr, céréales qui étaient à la base de l'alimentation principale des populations intoxiquées. Les symptômes de l'A.T.A. chez l'homme ont été reproduits expérimentalement chez des rats après administration per os de cultures de ces deux espèces fongiques qui sécrètent des trichothécènes. Ces expériences confirment l'étiologie probable des trichothécènes dans l'aleucie toxique alimentaire chez l'homme.

Toxicoses dues aux trichothécènes pour lesquelles les enquêtes analytiques et/ou épidémiologiques suggèrent une implication humaine.

Toxicose	Pays et espèces affectées	Moisissures responsables	Symptômes généraux	Rf.
Aleucie toxique alimentaire (A.T.A.)	URSS : homme, animaux domestiques	<i>Fusarium poae</i> <i>Fusarium sporotrichioides</i>	Vomissements, lésions nécrotiques de la cavité buccale, de l'oesophage et de l'estomac, leucopénie sévère	8
Stachybotryotoxicose	URSS : homme, cheval	<i>Stachybotrys atra</i>	Choc, stomatite, nécrose dermique, leucopénie	293
Dendrochiotoxice	URSS : homme, mouton, cochon	<i>Dendrochium toxicum</i>	Inflammation, hémorragies	293
Toxicose "Taulmelgetroide"	Sibérie : homme, cheval, cochon, volaille	<i>Gibberella saubinetii</i> <i>Fusarium roseum</i>	Maux de tête, coups de froid, nausées, vomissements	8
Toxicose "Red-mold"	Japon : homme, cheval, cochon, vache	<i>Fusarium graminearum</i>	Vomissements, hémorragies au niveau des poumons, des capsules surrénales et des intestins, refus de nourriture	8

CONCLUSION

Les observations d'intoxications naturelles chez les animaux et parfois chez l'homme, et d'intoxications animales expérimentales ont permis de bien définir les effets toxiques des quatre groupes de mycotoxines étudiés.

Les aflatoxines présentent le plus d'intérêt du fait de leur toxicité et de leurs implications très probables dans certaines pathologies humaines. Des lésions hépatiques aiguës et chroniques ont été observées chez les animaux dues à ce groupe de toxines, particulièrement l'aflatoxine B₁ qui est l'un des plus puissants hépatocancérogènes connus.

On ne dispose guère de renseignements quant au rapport qui pourrait exister chez l'homme entre l'hépatotoxicité aiguë et l'exposition aux aflatoxines. Mais des cas de lésions hépatiques aiguës ont été observés qui pourraient être imputables à une aflatoxicose aiguë.

Le cancer du foie est plus commun dans certaines régions d'Afrique et d'Asie du Sud-Est que dans les autres parties du monde. Par ailleurs, en confrontant les informations épidémiologiques locales aux données issues d'expériences faites chez l'animal, il apparaît qu'un accroissement d'exposition aux aflatoxines pourrait augmenter les risques de cancer primitif du foie.

En ce qui concerne les ochratoxines, la zéaralénone et les trichothécènes, leurs effets toxiques n'ont été prouvés que chez l'animal. Aucun effet toxique imputable à ces toxines n'a été observé dans une pathologie humaine. Toutefois, il semble bien que les trichothécènes aient été impliqués dans l'aleucie toxique alimentaire qui a sévi en URSS mais aucun cas de cette affection n'a été signalé depuis la fin de la seconde guerre mondiale.

CONCLUSION

-:-:-:-:-

Les effets toxiques de ces diverses mycotoxines sur l'animal ayant été vus, ainsi que leurs rôles étiologiques suspectés mais non prouvés dans certaines toxicoses humaines, sauf en ce qui concerne les aflatoxines, il semble logique de voir les implications possibles de ces mycotoxines au niveau de la santé humaine. Peut-on évaluer justement les risques pour la santé humaine de ces toxines fongiques, d'après toutes les données scientifiques établies jusqu'à présent ? Si risques, il y a, quels sont les moyens adéquats pour les limiter au maximum ?

La principale source d'exposition de l'homme aux aflatoxines, surtout l'aflatoxine B₁, est la nourriture contaminée. L'incidence de cette exposition sur la santé de l'homme doit être envisagée

a) d'une part sous l'angle de l'ingestion directe d'aflatoxines dans les aliments d'origine végétale contaminés comme le maïs, les arachides, les noix et leurs dérivés,

b) d'autre part, sous celui de l'ingestion d'aflatoxines, qui provenant des aliments du bétail, sont passées dans le lait et les produits laitiers, y compris les fromages et le lait en poudre. Dans le lait et les produits laitiers, l'aflatoxine principalement présente est l'aflatoxine M₁ (l'aflatoxine B₁ se trouvant à faible dose par rapport à l'aflatoxine M₁).

Du fait que dans l'organisme des animaux supérieurs l'élimination des aflatoxines est rapide, ceci laisse supposer qu'il n'y a pas d'accumulation d'aflatoxines dans les tissus et, par conséquent, la principale source de contamination secondaire d'aflatoxines se fait par le lait et les produits laitiers. De plus, la présence d'aflatoxines dans des tissus animaux n'a été détectée qu'au cours d'expériences sur l'animal ; aucune présence naturelle n'a été trouvée.

L'exposition de l'homme aux aflatoxines par la voie a) est probablement bien plus élevée que par la voie b). Les taux d'aflatoxines sont général-

lement plus élevés dans les aliments d'origine végétale que dans les aliments d'origine animale. De plus, dans le lait contaminé, le taux d'aflatoxines est 300 fois plus faible que le taux d'aflatoxines ingéré par l'animal, limitant ainsi considérablement le risque pour la santé humaine.

La prolifération fongique et la production d'aflatoxines sont tributaires des conditions d'humidité et de température qui sont optimales dans les régions tropicales et subtropicales. Mais, ces conditions sont parfois favorables à la production d'aflatoxines par certaines espèces fongiques dans des régions plus froides, comme cela s'est vu en Europe septentrionale. D'après toutes les données sur la présence naturelle de moisissures productrices d'aflatoxines sur diverses denrées alimentaires, surtout végétales, il apparaît que certaines denrées sont des substrats particulièrement favorables à la prolifération fongique et à la production d'aflatoxines. Il s'agit de graines oléagineuses (cacahuètes, noix diverses, graines de cotonnier) et de certaines céréales (maïs).

Dans les régions tropicales et subtropicales (régions d'Afrique, Inde, Indonésie), un autre facteur important vient s'ajouter aux facteurs d'humidité et de température favorables à la production d'aflatoxines. Ce facteur englobe les conditions socio-économiques précaires que l'on trouve dans ces régions, entraînant une consommation journalière importante, et parfois exclusive, de céréales ou de légumineuses (arachides) et de leurs dérivés (farine, huile). Ainsi, de telles conditions de nutrition peuvent entraîner une ingestion quotidienne importante d'aflatoxines.

Au contraire, dans les pays à niveau de vie élevé, la diversité des aliments constituant la ration journalière, les divers contrôles effectués au niveau des denrées végétales par les fabricants, ainsi que la mise en place dans plusieurs pays de taux de tolérance d'aflatoxines dans diverses denrées alimentaires, sont autant de facteurs qui limitent au maximum les risques d'intoxication. Le problème de la présence d'aflatoxines dans les denrées alimentaires provenant d'animaux ayant consommé des aliments contaminés, est d'un intérêt d'autant plus grand que parmi ces denrées, le lait, aliment de base du jeune enfant, est un vecteur de l'aflatoxine. Bien que les quantités d'aflatoxine M_1 dans le lait soient beaucoup plus faibles que celles de l'aflatoxine B_1 dans les denrées végétales, le jeune enfant, dans les régions tropicales, court un risque non négligeable d'une exposition aux aflatoxines.

Les cas d'intoxication aiguë (hépatopathie aiguë), du syndrome de Reye et d'intoxication chronique (cancer du foie et diverses hépatopathies),

dus à l'ingestion d'aflatoxines, sont à prendre au sérieux, car ces cas pathologiques peuvent se reproduire lors de conditions naturelles favorables (humidité, température) au développement de moisissures toxigènes sur certaines denrées alimentaires.

L'effet le plus inquiétant des aflatoxines est l'induction possible d'un cancer du foie chez l'homme. Il faut bien reconnaître que les expériences faites sur l'animal suggèrent clairement l'existence d'une cancérogénicité des aflatoxines à dose-réponse bien définie. De plus, des études démographiques associant des estimations de l'apport d'aflatoxines et des relevés de l'incidence du cancer primitif du foie, ont révélé une corrélation positive entre l'ingestion d'aflatoxines et ce cancer chez l'homme.

Bien que ces intoxications aflatoxiniques soient relativement peu nombreuses, il est prudent de limiter le risque d'exposition des aliments à ces toxines, par des traitements chimiques de détoxification des aliments de base.

En dehors des méthodes de détoxification, dans certains pays, des taux de tolérance d'aflatoxines dans diverses denrées alimentaires ont été fixés. C'est ainsi qu'en 1974, au niveau de la C.E.E., un taux limite tolérable d'aflatoxine B₁ a été fixé pour les aliments du bétail. Aux Etats-Unis, ce taux est fixé à 15 µg/kg pour tous les produits.

Il serait souhaitable que ces mesures de contrôle des aliments, de détoxification des aliments en cas de contamination décelée, ainsi que la mise en place de taux limite de tolérance d'aflatoxines dans les aliments favorables à une contamination fongique, se développent surtout dans les pays tropicaux et subtropicaux à haut risque, afin de limiter au maximum toute intoxication aflatoxinique.

En ce qui concerne les ochratoxines, les études sont principalement axées sur l'ochratoxine A, du fait que c'est la seule du groupe des ochratoxines à avoir été décelée dans diverses denrées alimentaires, destinées aussi bien aux animaux qu'à l'homme, et ceci à des doses allant de traces à des doses élevées. L'effet néphrotoxique de l'ochratoxine A a été nettement défini au cours d'expériences sur divers animaux. A l'heure actuelle, aucune preuve n'a été apportée en ce qui concerne un rôle étiologique de cette toxine dans certaines maladies humaines. Il convient, toutefois, de souligner l'hypothèse d'un rôle étiologique de l'ochratoxine A dans la néphropathie endémique des Balkans. Malgré l'absence de preuve, l'ochratoxine A demande à être prise au

sérieux en ce qui concerne les risques pour la santé humaine du fait de son activité néphrotoxique constatée chez les animaux et de sa présence assez fréquente dans certaines denrées alimentaires principalement d'origine végétale.

Bien que la zéaralénone ait été décelée dans un nombre limité de produits à base de maïs destinés à l'alimentation humaine, mais dans la plupart des cas à des taux faibles, aucun effet toxique de la zéaralénone n'a jusqu'alors été noté chez l'homme, minimisant ainsi grandement les risques pour la santé humaine.

A ce jour, les trichothécènes n'ont été décelés que très sporadiquement dans des produits naturels. Les observations faites sur animal lors d'intoxications naturelles et au cours d'expériences en laboratoire ont permis de définir les effets toxiques des trichothécènes. Ces toxines sont grandement suspectées dans certaines toxicoses humaines, en particulier l'aleucie toxique alimentaire (A.T.A.) qui s'est manifestée dans certaines régions d'URSS, il y a environ 40 ans. Cette toxicose était due à l'ingestion de grains de céréales moisies, et causa la mort de nombreuses personnes parmi la population. Cependant, grâce à l'amélioration des méthodes de récolte, de la production alimentaire et des conditions de stockage, la maladie a disparu. Aucune nouvelle épidémie n'a été signalée.

Des quatre groupes de mycotoxines étudiés dans ce travail, seules les aflatoxines sont reconnues comme étant associées à des effets bien définis sur la santé humaine, effets dont le plus important est l'induction possible d'un cancer au niveau hépatique. Bien que plusieurs aspects de la relation entre l'exposition aux aflatoxines et les risques de cancérogénèse chez l'homme restent à élucider par de nouvelles études expérimentales et épidémiologiques, le groupe des aflatoxines doit être pris très au sérieux quant à la santé humaine et les résultats déjà obtenus sur la toxicité de ces métabolites fongiques justifient pleinement la mise en place ou l'intensification de programmes anti-aflatoxiniques nationaux.

BIBLIOGRAPHIE

-:-:-:-:-:-:-:-:-:-

1. MOREAU (C.), 1974 - Les moisissures toxiques dans l'alimentation, Masson Ed.
2. JEMMALI (M.), Juillet-Août 1979 - La Recherche, n° 102, 724-731.
3. Mycotoxines. Critères d'hygiène de l'environnement. II. Organisation mondiale de la Santé, Genève, 1980.
4. SARGEANT (K.), SHERIDAN (A.), O'KELLY (J.) and CARNAGHAN (R.B.A.), 1961 - Toxicity associated with certain samples of groundnuts. Nature, 192, 1096-1097
5. VAN DER MERWE (K.J.), STEYN (P.S.), FOURIE (L.), DE SCOTT (B.) and THERON (J.J.), 1965 - Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wihl. Nature (London), 205, 1112-1113.
6. KROGH (P.) - La néphropathie mycotoxique. In : "Les mycotoxines", Ed. Inserm, Paris, 10 Mai 1975, vol. 46, 57-68.
7. Mc NUTT (S.H.), PURWIN (P.) and MURRAY (C.), 1928 - Vulvovaginitis in swine. J. Am. Vet. Med. Assoc., 73, 484.
8. UENO (Y.), 1977 - Mode of action of trichothecenes. Ann. Nutr. Alim., 31, 885-900.
9. SCOTT (P.M.) - La patuline. In : "Les mycotoxines", Ed. Inserm, Paris, 10 Mai 1975, vol. 46, 79-88.
10. WEI (R.D.), STILL (P.E.), SMALLEY (E.B.), SCHNOES (H.K.) and STRONG (F.M.), 1973 - Isolation and partial characterization of a mycotoxin from *Penicillium roqueforti*. Appl. Microbiol., 25, 111-114.
11. LAFONT (P.), 1974 - Contamination de produits oléagineux par les mycotoxines et mycotoxicoses liées à la consommation de ces produits. Revue Française des Corps Gras, n° 2, 77-84.
12. JEMMALI (M.) - Les mycotoxines contaminants naturels. In : "Les mycotoxines", Ed. Inserm, Paris, 10 Mai 1975, vol. 46, 27-38.
13. RODRICKS (J.V.) and STOLOFF (L.), 1977 - Food producing animals. In : Rodricks J.V., Hesseltine C.W. and Mehlman M.A., ed. Mycotoxins in human and animal health, Park Forest South, IL, USA, Pathotox Publishers Inc., 67-79.

14. TABER (H.H.) and SHROEDER (H.W.), 1967 - Aflatoxin-production potential of isolates of the *Aspergillus flavus - oryzae* group from peanuts (*Arachis hypogea*). *Appl. Microbiol.*, 15, 140-144.
15. STOLOFF (L.), 1976 - Occurrence of mycotoxins in food and feeds. In : Rodricks J.V. Ed., *Mycotoxins and other fungal related food problems*, Washington, DC, Amer. Chem. Soc., 23-50 (Advances in Chemistry Series 149).
16. Anonymous, 1974 - *Flavour Ind.*, 5, 18-22.
17. HALLIDAY (D.) and KAZAURE (I.), 1967 - Rep. Nigerian Stored Product Research Institute, 73-78.
18. HABISH (H.A.), ABDULLA (M.H.) and BROADBENT (J.H.), 1971 - The incidence of aflatoxin in Sudanese groundnuts. *Trop. Sci.*, 8, 279-287.
19. LOPEZ (A.) and CRAWFORD (M.A.), 1967 - Aflatoxin content of groundnuts sold for human consumption in Uganda. *Lancet*, 2, 1351-1354.
20. SHANK (R.C.), WOGAN (G.N.), GIBSON (J.B.) and NONDASUTA (A.), 1972 - Dietary aflatoxins and human liver cancer. II. Aflatoxin in marked foods and foodstuffs of Thailand and Hong-Kong. *Food Cosmet. Toxicol.*, 10, 61-69.
21. JONES (B.D.), 1957 - Proceedings of the Conference on animal feeds of tropical and subtropical origin, London, 1974. *Tropical Products Institute*, London, 273-290.
22. HESSELTINE (C.W.), ROGERS (R.F.) and SHOTWELL (O.L.), 1981 - Aflatoxin and mold flora in North Carolina, USA in 1977 corn crop. *Mycologia*, 73, 2, 216-228.
23. SHOTWELL (O.L.), HESSELTINE (C.W.) and GOULDEN (M.L.), 1973 - Incidence of aflatoxin in southern corn, 1969-1970. *Cereal Sci. Today*, 18, 192-195.
24. SHOTWELL (O.L.), HESSELTINE (C.W.), VANDEGRAFT (E.E.) and GOULDEN (M.L.), 1971 - Survey of corn from different regions for aflatoxin, ochratoxin and zearalenone. *Cereal Sci. Today*, 16, 226-273.
25. DIENER (U.L.) and DAVIS (N.D.), 1969 - Aflatoxin formation by *Aspergillus flavus* : Occurrence of *Aspergillus flavus* and aflatoxin. In L.A. Goldblatt (Ed.) : *Aflatoxin : Scientific Background Control and Implications*, Acad. Press, New-York, Vol. 1.

26. HAMILTON (P.B.), 1971 - A natural and extremely severe occurrence of aflatoxicosis in laying hens. *Poult. Sci.*, 50, 1880-1882.
27. SMITH (J.W.) and HAMILTON (P.B.), 1970 - Aflatoxicosis in the broiler chicken. *Poult. Sci.*, 49, 207-215.
28. LAFONT (P.) and LAFONT (J.), 1970 - Contamination de produits céréaliers et d'aliments du bétail par l'aflatoxine. *Food Cosmet. Toxicol.*, 8, 403-408.
29. OYENIRAN (J.O.), 1973 - Rep. Nigerian Stored Product Research Institute, 1970, p. 47.
30. TOURY (J.), GIORGI (R.), MONJOUR (L.), QUENEM (C.), DELASSUS (M.) and VALETTE (R.), 1967 - *Organ. Recherches Aliment. Nutr. Africaines, Dakar, Rep.*, 19.
31. PURCHASE (I.F.H.) and GONCLAVES (T.), 1971 - Preliminary results from food analysis in the Inhambane area. In I.F.H. Purchase (Ed.) : Symposium on mycotoxins in human health, Elsevier, Amsterdam, 263-269.
32. ALPERT (M.E.), HUTT (M.S.R.), WOGAN (G.N.) and DAVIDSON (C.S.), 1971 - Association between aflatoxin content of food and hepatoma frequency in Uganda. *Cancer*, 28, 253-260.
33. KRISHNAMACHARI (K.A.V.R.), BHAT (R.V.), NAGARAJAN (V.) and TILAK (T.B.G.), 1975 - Hepatitis due to aflatoxicosis outbreak in western India. *Lancet*, May 10th, 1061-1063.
34. CONNOLE (M.D.) and HILL (M.W.M.), 1970 - *Aspergillus flavus* contaminated sorghum grains as a possible cause of aflatoxicosis in pigs. *Aust. Vet. J.*, 46, 503-505.
35. VAN WALBEEK (W.), SCOTT (P.M.) and THATCHER (F.S.), 1968 - Mycotoxins from food-borne fungi. *Can. J. Microbiol.*, 14, 131-137.
36. SHOTWEIL (O.L.), HESSELTINE (C.W.), BURMEISTER (H.R.), KWOLEK (W.F.), SHANNON (G.M.) and HALL (H.H.), 1969 - Survey of cereal grains and soybeans for the presence of aflatoxin. I. Wheat, grain sorghum and oats. *Cereal Chem.*, 46, 446-454.
37. WATSON (S.A.) and YAHL (K.R.), 1971 - Survey of aflatoxins in commercial supplies of corn and grain sorghum used for wet-milling. *Cereal Sci. Today*, 16, 153-155, 163.

38. SHROEDER (H.W.) and BOLLER (R.A.), 1973 - Aflatoxin production of species and strains of the *Aspergillus flavus* group isolated from field crops. *Appl. Microbiol.*, 25, 885-889.
39. COADY (A.), 1965 - *Ethiopian Med. J.*, 3, 173-185.
40. WHEELER (B.), 1969 - *Irish J. Agric. Res.*, 8, 172-174.
41. KURATA (H.) and TANABE (H.), 1973 - 2nd Int. Congr. Plant Pathol. Minneapolis, Minnesota, Abstr., 0361.
42. SHULTZ (J.) and MOTZ (R.), 1967 - Toxinbildende *Aspergillus flavus* stamme in futtermitteln. *Arch. Exp. Vet.*, 21, 129-140.
43. PHELPS (R.A.), 1967 - In J.E. Halver and I.A. Mitchell (Eds) : Trout Hepatoma Research Conference Papers, Bureau Sport Fisheries, Wildlife, U.S. Dept. Interior, Washington, D.C.
44. CAMPBELL (T.C.) and SALAMAT (L.), 1971 - Aflatoxin ingestion and excretion by humans. In I.F.H. Purchase (Ed.) : Symposium on mycotoxins in human health, Elsevier, Amsterdam, 271-280.
45. LUCAS (F.V.), MONROE (P.), NGA (P.V.), TOWNSEND (J.F.) and LUCAS (F.V.Jr.), 1971 - Mycotoxin contamination of South Vietnamese rice. *J. Trop. Med. Hyg.*, 74, 182-184.
46. WHITTEN (M.A.), 1969 - Screening cottonseed for aflatoxins. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 46, 39-40.
47. NAGARAJAN (V.), BHAT (R.V.) and TULPULE (T.G.), 1973 - Aflatoxin production in some varieties of soybeans (*Glycine max* L.). *Experientia*, 29, 1302-1303.
48. BEAN (G.A.), SCHULLINGER (J.A.) and KLARMAN (W.L.), 1972 - Occurrence of aflatoxins and aflatoxin producing strains of *Aspergillus spp.* in soybeans. *Appl. Microbiol.*, 24, 437-439.
49. CAMPBELL (T.C.), 1969 - 83rd Meeting, Assoc. Off. Anal. Chemists, Washington.
50. ARESECULERATNE (S.N.) and DE SILVA (L.M.), 1971 - *Ceylon J. Med. Sci.*, 20, 60-75.
51. YNDESTAD (M.) and UNDERDAL (B.), 1975 - Présence d'aflatoxine dans les aliments vendus sur le marché norvégien. *Nord.Vet. Med.*, 27, 42-48.

52. NILSSON (G.), 1974 - Aflatoxin in nuts. *Vor Föda*, 26, 56-62.
53. SCHADE (J.E.), Mc GREEVY (K.), KING (A.D.), MACKEY (B.) and FULLER (G.), 1975 - Incidence of aflatoxin in California almonds. *Appl. Microbiol.*, 29, 48-53.
54. Anonymous, 1970 - Report of the Tropical Products Institute, 1968-1969, H.M. Stationery Office, London, p. 7.
55. RAHNEMA (R.), 1972 - Control of mycotoxins and detoxification in pistachio nuts. Ministry of Industry, Inst. of standards and Industrial Research of Iran, p. 21.
56. SHANK (R.C.), WOGAN (G.N.), GIBSON (J.B.) and NONDASUTA (A.), 1972 - Dietary aflatoxins and human liver cancer. II. Aflatoxins in market foods and foodstuffs of Thailand and Hong-Kong. *Food Cosmet. Toxicol.*, 10, 71-84.
57. SCOTT (P.M.) and KENNEDY (B.P.C.), 1973 - Analysis and survey of ground black, white and capsicum peppers for aflatoxins. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 56, 1452-1457.
58. STRZELECKI (E.L.) and GASIOROWSKA (U.W.), 1974 - Aflatoxin B₁ in feed stuffs. *Zentralbl. Vet. Med. B*, 21, 395-400.
59. SEIBOLD (R.) and RUCH (W.), 1977 - Teneur en aflatoxines d'aliments mixtes pour vaches laitières. *Kraftfutter*, 60, 182-185.
60. KIERMEIER (F.), WEISS (G.), BEHRINGER (G.), MILLER (M.) and RANFFT (K.), 1977 - Sur la présence et la concentration d'aflatoxine M₁ dans le lait livré à une laiterie. *Z. Lebensmitt.-Unters.-Forsch.*, 163, 171-174.
61. KIERMEIER (F.), 1973 - Aflatoxin residues in fluid milk-Pure. *Appl. Chem.*, 35, 271-274.
62. KIERMEIER (R.), 1977 - The significance of aflatoxins in the dairy industry. *Annu. Bull. Int. Dairy Fed.*, 98, 1-23, 25-43.
63. POLZHOFFER (K.), 1977 - Dosage des aflatoxines dans le lait et les produits laitiers. *Z. Lebensmitt.-Unters.-Forsch.*, 163, 175-177.
64. VAN PEE (W.), VAN BRABANT (J.) and JOOSTENS (J.), 1977 - La détection et le dosage de l'aflatoxine M₁, dans le lait et le lait en poudre. *Rev. Agric. (Bruxelles)*, 30, 403-415.

65. PAUL (R.), KALRA (M.S.) and SINGH (A.), 1976 - Incidence of aflatoxins in milk and milk products. *Indian J. Dairy Sci.*, 29, 318-322.
66. SCHULLER (P.L.), VERHÜLSDONK (C.A.H.) and PAULSCH (W.E.), 1973 - Analysis of aflatoxin M₁ in liquid and powdered milk. *Pure Appl. Chem.*, 35, 291-296.
67. FRITZ (W.), DONATH (R.) and ENGST (R.), 1977 - Dosage et fréquence des aflatoxines M₁ et B₁ dans le lait et les produits laitiers. *Nahrung*, 21, 79-84.
68. PATTERSON (D.S.P.), SHREEVE (B.J.) and ROBERTS (B.A.) (in press) - Mycotoxin residues in body fluids and tissues of food producing animals. In : Proceedings of the 12th International Congress Microbiology, München, Federal Republic of Germany, 3-8 September 1978.
69. LÜCK (H.), STEYN (M.) and WEHNER (F.C.), 1977 - A survey of milk powder for aflatoxin content. *S. Afr. J. Dairy Technol.*, 8, 85-86.
70. NEUMANN-KLEINPAUL (A.) and TERPLAN (G.), 1972 - La présence d'aflatoxine M₁ dans les produits laitiers déséchés. *Arch. Lebensmittelhyg.*, 23, 128-132.
71. HANSEN (E.) and JUNG (M.), 1972 - Sur la présence d'aflatoxines dans les denrées alimentaires non moisies. Proportions d'échantillonnage. *Z. Lebensmitt.-Unters.-Forsch.*, 150, 141-145.
72. JUNG (M.) and HANSEN (E.), 1974 - Présence d'aflatoxine M₁ dans les produits déséchés. *Food Cosmet. Toxicol.*, 12, 131-138.
73. FDA, 1977 - Report on action level for aflatoxin M₁ in milk. Washington DC, 21 november, Bureau of Foods, US Food and Drug Administration.
74. SAITO, KAZUO, MOTOHIRO NISHIJIMA, KASUO YASUDA, HISASHI KAMIMURA, AKIHIRO IBE, TOSHIHIRO NAGAYAMA, HIROFUMI USHIYAMA and YASUTA NAOI 1980 recd 1981 - Natural occurrence of aflatoxins in commercial cheese (studies on mycotoxins in food : 14). *J. Food Hyg. Soc. JPN*, 21, 6, 472-475.
75. JONES (B.D.), 1977 - In *Mycotoxic fungi, mycotoxins, mycotoxicoses*. Wyllie T.D. and Morehouse L.G. Ed., Marcel Dekker, Inc., vol. 1, pp. 192 and 195.
76. GORST-ALLMAN (C.P.) and STEYN (P.), 1979 - Screening methods for the detection of thirteen common mycotoxins. *J. Chromatogr.*, 175, 325-331.

77. SCOTT (P.M.), VAN WALBEEK (W.), KENNEDY (B.), ANYETI (D.), 1972 - Mycotoxins (ochratoxin A, citrinin and sterigmatocystin) and toxigenic fungi in grains and other agricultural products. *Agric. Food Chem.*, 20, 1103-1109.
78. KROGH (P.), HALD (B.) and PEDERSON (E.J.), 1973 - Occurrence of ochratoxin A and citrinin in cereals associated with mycotoxic porcine nephropathy. *Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. B*, 81, 689-695.
79. KROGH (P.), 1978 - Causal associations of mycotoxic nephropathy. *Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. A, Suppl. n° 269*.
80. GALTIER (P.), 1975 - Métabolisme et mode d'action d'ochratoxine A. In : Biquet J. and Jemmali M. *Les mycotoxines*, Paris, Ed. INSERM, 46, 69-78.
81. JUSZKIEWICZ (T.) and PISKORSKA-PLISZCZYNSKA (J.), 1976 - Présence d'aflatoxines B₁, B₂, G₁ et G₂, d'ochratoxines A et B, de stérigmatocystine et de zéaralénone dans les céréales. *Med. Weter.*, 32, 617-619.
82. JUSZKIEWICZ (T.) and PISKORSKA-PLISZCZYNSKA (J.), 1977 - Présence de mycotoxines dans des mélanges et concentrés alimentaires pour animaux. *Med. Weter.*, 33, 193-196.
83. KROGH (P.), AXELSEN (N.H.), ELLING (F.), GYRD HANSEN (N.), HALD (B.), HYLDGAARD JENSEN (J.), LARSEN (A.E.), MADSEN (A.), MORTENSEN (H.P.), MØLLER (T.), PETERSEN (O.K.), RAVNSKOV (U.), ROSTGAARD (M.) and AALUND (O.), 1974 - Experimental porcine nephropathy : Changes of renal function and structure induced by ochratoxin A contaminated feed. *Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. A, Suppl. n° 246*, p. 9.
84. KROGH (P.), HALD (B.) PLESTINA (R.), CEOVIC (S.), 1977 - Balkan (endemic) nephropathy and foodborne ochratoxin A : Preliminary results of a survey of foodstuffs. *Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. B*, 85, 238-240.
85. NESHEIM (S.), 1971 - Report on ochratoxins : Occurrence, production, analysis and toxicity. In : Abstracts of the 85th Annual meeting of the Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C., Oct. 11-14, 1971, p. 23.
86. LEVI (C.P.), TRENK (H.L.) and MOHR (H.K.), 1974 - A study of the occurrence of ochratoxin in green coffee beans. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 57, 866-870.

87. SHOTWELL (O.L.), HESSELTINE (C.W.) and GOULDEN (M.L.), 1969 - Ochratoxin A : Occurrence as natural contaminant of a corn sample. *Appl. Microbiol.*, 17, 765-766.
88. SHOTWELL (O.L.), GOULDEN (M.L.) and HESSELTINE (C.W.), 1976 - Survey of US wheat for ochratoxin and aflatoxin. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 59, 122-124.
89. HALD (B.) and KROGH (P.), 1972 - Ochratoxin residues in bacon pigs. In : Abstracts, IUPAC -Sponsored Symposium, Control of Mycotoxins, Kungälv, Göteborg, Sweden, 21-22 Aug. 1972, Göteborg, Sweden, Swedish Institute for Food Preservation Research, p. 18.
90. KROGH (P.), 1977 - Ochratoxin A residues in tissues of slaughter pigs with nephropathy. *Nord. Vet. Med.*, 29, 402-405.
91. RUTQVIST (L.), BJÖRKLUND (N.D.), HULT (K.) and GATENBECK (S.), 1977 - Spontaneous occurrence of ochratoxin residues in kidneys of fattening pigs. *Zentralbl. Vet. Med. A*, 24, 402-408.
92. ELLING (F.), HALD (B.), JACOBSEN (CHR.) and KROGH (P.), 1975 - Spontaneous toxic nephropathy in poultry associated with ochratoxin A. *Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. A*, 83, 739-741.
93. HACKING (A.), ROSSER (W.R.) and DERVISH (M.T.D.), 1977 - Incidence of Zearalenone producing strains of *Fusarium* in barley seeds. *Ann. Nutr. Alim.*, 31, 557-562.
94. EPPLEY (R.M.), STOLOFF (L.), TRUCKSESS (M.W.) and CHUNG (C.W.), 1974 - Survey of corn for *Fusarium* toxins. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 57, 632-635.
95. WARE (G.M.) and THORPE (C.W.), 1977 - Analysis for zearalenone in corn by high pressure liquid chromatography with a fluorescence detector. Abstracts 91st Annual Meeting, Assoc. Off. Anal. Chem., Washington, DC, p. 47 (Abstract n° 148).
96. LOVELACE (C.E.A.) and NYATHI (C.B.), 1977 - Estimation of the fungal toxins, zearalenone and aflatoxin, contaminating opaque maize beer in Zambia. *J. Sci. Food Agric.*, 28, 288-292.
97. MARTIN (P.M.D.) and KEEN (P.), 1978 - The occurrence of zearalenone in raw and fermented products from Swaziland and Lesotho. *Sabrouandia*, 16, 15-22.

98. SCOTT (P.M.), PANALAKS (T.), KANHERE (S.) and MILES (W.F.), 1978 - Determination of zearalenone in cornflakes and other corn-based foods by thin layer chromatography, high pressure liquid chromatography, and gas-liquid chromatography (high resolution mass spectrometry). J. Assoc. Off. Anal. Chem., 61, 593-600.
99. JEMMALI (M.), MAZERAND (C.), 1980 - Présence de zéaralénone ou F-2 dans les noix du commerce. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), 131 B, 319-321.
100. HSU (I.CH.), SMALLEY (E.B.), STRONG (F.M.) and RIBELIN (W.E.), 1972 - Identification of T-2 toxin in moldy corn associated with a lethal toxicosis in dairy cattle. Appl. Microbiol., 24, 684-690.
101. PULS (R.) and GREENWAY (J.A.), 1976 - Fusariotoxicosis from barley in British Columbia. II. Analysis and toxicity of suspected barley. Can. J. Comp. Med., 40, 16-19.
102. MIROCHA (C.J.), PATHRE (S.V.), SHAUERHAMER (B.) and CHRISTENSEN (C.M.), 1976 - Natural occurrence of *Fusarium* toxins in feedstuff. Appl. Environ. Microbiol., 32, 553-556.
103. MOROOKA (N.), URATSUJI (N.), YOSHIJAWA (T.) and YAMAMOTO (H.), 1972 - Etudes sur les substances toxiques dans l'orge infesté par *Fusarium* spp. Jpn. J. Food Hyg., 13, 368-375.
104. YESONDER (R.F.), CIEGLER (A.) and JENSEN (A.H.), 1973 - Isolation of the emetic principle from *Fusarium*-infected corn. Appl. Microbiol., 26, 1008-1010.
105. SANDERS (T.H.), DAVIS (N.D.) and DIENER (U.L.), 1968 - Effect of carbon dioxide, temperature and relative humidity on production of aflatoxin in peanuts. J. Am. Oil Chem. Soc., 45, 683-685.
106. DAVIS (N.D.) and DIENER (U.L.), 1970 - Environmental factors affecting the production of aflatoxin. In : Herzberg, M. ed. Proceedings of the First US-Japon Conference on "Toxic Microorganisms", Washington, DC, US Govt Printing Office, 43-47.
107. NORTHOLT (M.D.) and VAN EGMOND (H.P.), 1981 - Limits of water activity and temperature on the production of some mycotoxins. 4th Meeting Mycotoxins and Animal Disease, Weybridge, in press.
108. NORTHOLT (M.D.), VERHULSDONK (C.A.H.), SOENTORO (P.S.S.) and PAULSCH (W.E.), 1976 - Effect of water activity and temperature on aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. J. Milk Food Technol., 39, 170-174.

109. ABDOLLAHI (A.) and BUCHANAN (R.L.), 1981 - Regulation of aflatoxin biosynthesis : Induction of aflatoxin production by various carbohydrates. J. Food Sci., 46, 2, 633-635.
110. GUILBOT (A.), JEMMALI (M.), 1970 - Conditions de production de l'aflatoxine : Influence de composants du milieu de culture sur la production de la toxine. Cah. Nut. Diet., 5, 2, 51-52.
111. GUNASEKARAN (M.), 1981 - Optimum culture conditions for aflatoxin B₂ production by a human pathogenic strain of *Aspergillus flavus*. Mycologia, 73, 4, 697-704.
112. MABROUK, SOUHAIR (S.) and NEFISA (M.A.) EL-SHAYEB, 1981 - Aflatoxins : Production of the toxins on rice-corn steep medium according to some cultural conditions. Zentralbl. Bakteriolog. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Zweite Naturwiss Abt. Mikrobiol. Landwirtsch. Technol. Umweltschutzes, 136, 4, 330-340.
113. SCHINDER (A.F.), 1977 - Temperature limits for production of aflatoxin by 25 isolates of *A. flavus* and *A. parasiticus*. J. Food Prot., 40, 1, 39-40.
114. L'VOVA (L.S.), BYSTRYAKOVA (Z.K.) and SHATILOVA (T.I.), 1981 - Formation of mycotoxins during storage of freshly harvested corn. Prikl. Biokhim. Mikrobiol., 17, 5, 766-772.
115. SUH, MYANG (J.A.), 1979 - Recd 1980 - Study of the productivity of aflatoxin through the interaction of *Bacillus subtilis* and *Aspergillus flavus*. 1. The effects of culture conditions on the production of aflatoxin by *Aspergillus flavus*. Koebean J. Microbiol., 17, 1, 16-24.
116. REISS (J.), 1975 - Mycotoxins in foodstuffs. V. The influence of temperature, acidity and light on the formation of aflatoxins and patulin in bread. Eur. J. Appl. Microbiol., 2, 183-190.
117. BENNETT (J.W.), FERNHOLZ (F.A.) and LEE (L.S.), 1978 - Effect of light on aflatoxins, anthraquinones and sclerotia in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. Mycologia, 90, 104-116.
118. BENNETT (J.W.), DUNN (J.J.) and GOLDSMAN (C.I.), Feb. 1981 - Influence of white light on production of aflatoxins and anthraquinones in *Aspergillus parasiticus*. Appl. Environ. Microbiol., 41, 2, 488-491.

119. CLEVSTRÖM (G.), LJUNGGREN (H.), TEGELSTRÖM (S.) and TIDEMAN (K.), Aug. 1983 - Production of aflatoxin by an *Aspergillus flavus* isolate cultured under a limited oxygen supply. *Appl. Environ. Microbiol.*, 46, 2, 400-405.
120. DAVIS (N.D.), DIENER (U.L.) and AGNIHOTRI (V.P.), 1967 - Production of aflatoxin B₁ and G₁ in chemically defined medium. *Mycopathol. Mycol. Appl.*, 31, 251-254.
121. REDDY (T.V.), WISWANATHAN (L.) and VENKITASUBRAMANIAN, 1972 - Factors affecting aflatoxin production on a synthetic medium. *Biochem. J.*, 128, 61.
122. ADYE (J.C.) and MATELES (R.I.), 1964 - Incorporation of labelled compounds into aflatoxins. *Biochim. Biophys. Acta*, 86, 418-420.
123. MATELES (R.I.) and ADYE (J.C.), 1965 - Production of aflatoxins in submerged culture. *Appl. Microbiol.*, 13, 208-211.
124. LILLEHOJ (E.B.), GARCIA (W.J.) and LAMBROW (M.), Nov. 1974 - *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin production in corn : influence of trace elements. *Appl. Microbiol.*, 28, 5, 763-767.
125. LEE (E.G.H.), TOWNSLEY (P.M.) and WALDEN (C.C.), 1966 - Effect of bivalent metals on the production of aflatoxins in submerged cultures. *J. Food Sci.*, 31, 432-436.
126. SHROEDER (H.W.) and H. HEIN (Jr.), 1968 - Effect of diurnal temperature cycles on the production of aflatoxin. *Appl. Microbiol.*, 16, 988-990.
127. LIN (Y.C.), AYRES (J.C.) and KOELER (P.E.), Aug. 1980 - Influence of temperature cycling on the production of aflatoxin B₁ and G₁ by *Aspergillus parasiticus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 40, 2, 352-357.
128. VOLLBRECHT (D.) and EL NAWAWY (M.A.), 1980 - Restricted oxygen supply and excretion of metabolites. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 9, 1-8.
129. WECKBACH (L.S.) and MARTH (E.H.), 1977 - Aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* in a competitive environment. *Mycopathologia*, 62, 1, 39-45.
130. DRAUGHON (F.A.) and AYRES (J.C.), Apr. 1981 - Inhibition of aflatoxin production by selected insecticides. *Appl. Environ. Microbiol.*, 41, 4, 972-976.



131. DRAUGHON (F.A.), 1983 - Control or suppression of aflatoxin production with pesticides. South. Coop. Ser. Bull., 279, 81-86.
132. BEAN (G.A.) and SOUTHALL (A.), Aug. 1983 - Effect of pyridazone herbicides on growth and aflatoxin release by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. Appl. Environ. Microbiol., 46, 2, 503-505.
133. CHIPLEY (J.R.) and URAIH (N.), Aug. 1980 - Inhibition of *Aspergillus* growth and aflatoxin release by derivatives of benzoic acid. Appl. Environ. Microbiol., 40, 2, 352-357.
134. LENOVITCH, LAWRENCE (M.), 1981 - Effect of caffeine on aflatoxin production on cocoa beans. J. Food Sci., 46, 2, 655-657.
135. BUCHANAN (R.L.) and FLETCHER (A.M.), 1978 - Methylxanthine inhibition of aflatoxin production. J. Food Sci., 43, 654-655.
136. RAO (H.R.G.) and HAREIN (P.K.), 1972 - Dichlorvos as an inhibitor of aflatoxin production in wheat, corn, rice and peanuts. J. Econ. Entomol., 65, 988-990.
137. KHAN (S.N.), MAGGON (K.K.) and VENKITASUBRAMANIAN (T.A.), Aug. 1978 - Inhibition of aflatoxin biosynthesis by Tolnaftate. Appl. Environ. Microbiol., 36, 2, 270-273.
138. MAGGON (K.K.), GUPTA (S.K.) and VENKITASUBRAMANIAN (T.A.), 1977 - Biosynthesis of aflatoxins. Bacteriol. Rev. 41, 822-855.
139. STEWART (R.G.), WYATT (R.D.) and ASHMORE (M.D.), 1977 - The effect of various antifungal agents on aflatoxin production and growth characteristics of *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus* in liquid medium. Poultry Sci., 56, 1630-1635.
140. YAO (R.C.) and HSIEH (D.P.H.), 1974 - Steps of dichlorvos inhibition in the pathways of aflatoxin biosynthesis. Appl. Microbiol., 28, 52-57.
141. BIRCH (A.J.) and DONOVAN (F.W.), 1953 - Studies in relation to biosynthesis. I. Some possible route to derivatives of orcinol and phloroglucinol. Austral. J. Chem., 6, 360-368.
142. BIRCH (A.J.), 1967 - Biosynthesis of polyketides and related compounds. Science, 156, 202-206.
143. BENNETT (J.W.) and LEE (L.S.), October 1979 - Mycotoxins. Their biosynthesis in Fungi : Aflatoxins and other bisfuranoïds. J. Food Prot., 42, 10, 805-809.

144. BENNETT (J.W.), LEE (L.S.), SHOSS (S.M.) and BOUDREAUX (G.H.), Apr. 1980 - Identification of averantin as an aflatoxin B₁ precursor : Placement in the biosynthetic pathway. *Appl. Environ. Microbiol.*, 39, 4, 835-839.
145. HEATHCOTE (J.G.), DUTTON (M.F.) and HIBBERT (J.R.), 1976 - Biosynthesis of aflatoxins. Part II. *Chem. Ind.* 1976 : 207-272.
146. PAPA (K.E.), 1977 - A mutant of *Aspergillus flavus* producing more aflatoxin B₂ than B₁. *Appl. Environ. Microbiol.*, 33, 206.
147. ELSWORTHY (G.C.), HOLKER (J.S.E.), Mc KEOWN (J.M.), ROBINSON (J.B.) and MULHEIRN (L.J.), 1970 - The biosynthesis of aflatoxins. *Chem. Comm.* 1970, 1069-1070.
148. MAGGON (K.K.), GUPTA (S.K.) and VENKITASUBRAMANIAN (T.A.), 1977 - Biosynthesis of aflatoxins. *Bacteriol. Rev.*, 41, 822-855.
149. BACON (C.W.), SWEENEY (J.G.), ROBBINS (J.D.) and BURDICK (D.), 1973 - Production of penicillic acid and ochratoxin A on poultry feed by *Aspergillus ochraceus* : Temperature and moisture requirements. *Appl. Microbiol.*, 26, 155-160.
150. HARWIG (J.) and CHEN (Y.K.), 1974 - Some conditions favoring production of ochratoxin A and citrinin by *Penicillium veridicatum* in wheat and barley. *Can. J. Plant. Sci.*, 54, 17-22.
151. HUFF (W.E.) and HAMILTON (P.B.), October 1979 - Mycotoxins. Their biosynthesis in Fungi : Ochratoxins - Metabolites of combined pathways. *J. Food Prot.*, 42, 10, 815-820.
152. SCHROEDER (H.W.) and HEIN (Jr.), 1975 - A note on zearalenone in grain sorghum. *Cereal Chem.*, 52, 751.
153. EUGENIO (C.P.), 1970 - Factors affecting production of the mycotoxin F-2 by *Fusarium*. *Phytopathology*, 60, 1055-1057.
154. LIEBERMAN (J.), 1971 - Studies in the biosynthesis of F-2, a fungal estrogen produced by *Fusarium*. M.S. Thesis, University of Minnesota.
155. LARMOUR (R.) and MARCHANT (R.), 1977 - Carbon dioxide fixation and condensation in *Fusarium culmorum* grown in continuous culture. *J. Gen. Microbiol.*, 99, 59-68.
156. MIROCHA (C.J.) and PATHRE (S.V.), October 1979 - Mycotoxins. Their biosynthesis in Fungi : Zearalenone biosynthesis. *J. Food Prot.*, 42, 10, 821-824.

157. MIROCHA (C.J.), PATHRE (S.V.) and CHRISTENSEN (C.M.), 1974 - In : Wyllie T.D. and Morehouse L.G. Eds. Mycotoxic fungi, Mycotoxins, Mycotoxicoses. Marcel Dekker Inc., Vol. 1, 383-420.
158. CIEGLER (A.), October 1979 - Mycotoxins. Their biosynthesis in Fungi : Biosynthesis of the trichothecenes. J. Food Prot., 42, 10, 825-828.
159. NOZOE (S.) and MACHIDA (Y.), 1970 - Structure of trichodiene. Tetrahedron Lett., 2671-2674.
160. WOGAN (G.N.) and NEWBERNE (P.M.), 1967 - Dose-reponse characteristics of aflatoxin B₁ carcinogenesis in the rat. Cancer Res., 27, 2370-2376.
161. MINTZLAFF (H.J.), LÖTZSCH (R.), TAUCHMANN (F.), MEYER (W.) and LEISTNER (L.), 1974 - Résidus d'aflatoxine dans le foie et les muscles de poulets à rôtir nourris avec des aliments contenant de l'aflatoxine. Fleischwirtschaft, 54, 774-778.
162. KROGH (P.), HALD (B.), HASSELAGER (E.), MADSEN (A.), MORTENSEN (H.P.), LARSEN (A.E.) and CAMPBELL (A.D.), 1973 - Aflatoxin residues in bacon pigs. Pure Appl. Chem., 35, 275-282.
163. PATTERSON (D.S.P.), 1977 - In : Wyllie T.D. and Morehouse L.G. Eds. Mycotoxic Fungi, Mycotoxins, Mycotoxicoses. Marcel Dekker Inc., Vol. 1, 159-189.
164. CAMPBELL (T.C.), CAEDO (J.P.Jr.), BULATAO-JAYME (J.), SALAMAT (L.) and ENGEL (R.W.), 1970 - Aflatoxin M₁ in human urine. Nature (Lond.), 227, 403-404.
165. GALTIER (P.), 1974 - Devenir de l'ochratoxine A dans l'organisme animal. II. Distribution tissulaire et élimination chez le rat. Ann. Rech. Vet., 5, 319-328.
166. PATTERSON (D.S.P.), 1977 - Metabolic activation and detoxification of mycotoxins. Ann. Nutr. Alim., 31, 901-910.
167. CHU (F.S.), 1971 - Interaction of ochratoxin A with bovine serum albumin. Arch. Biochem. Biophys., 147, 359-366.
168. UENO (Y.), AYAKI (S.), SATO (N.) and ITO (T.), 1977 - Fate and mode of action of zearalenone. Ann. Nutr. Alim., 31, 935-948.
169. UENO (Y.) and TASHIRO (F.), 1981 - α -zearalenol, a major hepatic metabolite in rats of zearalenone, an estrogenic mycotoxin of *Fusarium species*. J. Biochem., 89, 563-571.

170. ASAO (T.), BÜCHI (G.), ABDEL-KADER (M.M.), CHANG (S.B.), WICK (E.L.) and WOGAN (G.N.), 1965 - The structures of aflatoxins B and G₁. J. Am. Chem. Soc., 87, 882-886.
171. CHANG (S.B.), ABDEL-KADER (M.M.), WICK (E.L.) and WOGAN (G.N.), 1963 - Aflatoxin B₂ : Chemical identity and biological activity. Science, 142, 1191-1192.
172. HARTLEY (R.D.), NESBITT (B.F.) and O'KELLY (J.), 1963 - Toxic metabolites of *Aspergillus flavus*. Nature (Lond.), 198, 1056-1058.
173. STUBBLEFIELD (R.D.), SHOTWELL (O.L.) and SHANNON (G.H.), 1972 - Aflatoxins M₁ and M₂ and parasiticol : Thin layer chromatography and physical and chemical properties. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 55, 762-767.
174. DALEZIOS (J.I.) and WOGAN (G.N.), 1972 - Metabolism of aflatoxin B₁ in rhesus monkeys. Cancer Res., 32, 2297-2303.
175. BÜCHI (G.), SPITZNER (D.), PAGLIALUNGA (S.) and WOGAN (G.N.), 1973 - Synthesis and toxicity evaluation of aflatoxin P₁. Life Sci., 13, 1143-1149.
176. MASRI (M.S.), HADDON (W.F.), LUNDIN (R.E.) and HSIEH (D.P.H.), 1974 - Aflatoxin Q₁ : a newly identified major metabolite of aflatoxin B₁ in monkey liver. J. Agric. Food Chem., 22, 512-514.
177. MASRI (M.S.), BOOTH (A.N.) and HSIEH (D.P.H.), 1974 - Comparative metabolic conversion of aflatoxin B₁ to aflatoxin M₁ and aflatoxin Q₁ in monkey liver. Life Sci., 15, 203-212.
178. DETROY (R.W.) and HESSELTINE (C.W.), 1970 - Aflatoxicol : structure of a new transformation product of aflatoxin B₁. Can. J. Biochem., 48, 830-832.
179. DUTTON (M.F.) and HEATHCOTE (J.G.), 1968 - The structure, biochemical properties and origin of the aflatoxins B_{2a} and G_{2a}. Chem. Ind., 418-421.
180. RODRICKS (J.V.), STOLOFF (L.), PONS (W.A.Jr.), ROBERTSON (J.A.) and GOLDBLATT (L.A.), 1970 - Molar adsorptivity values for aflatoxins and justification for their use as criteria of purity of analytical standards. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 53, 96-101.

181. BUTLER (W.H.), 1974 - Aflatoxin. In : Purchase, I.F.H. ed. Mycotoxins, Amsterdam, Elsevier, 1-28.
182. STEYN (P.S.) and HOLZAPFEL (C.W.), 1967 - The synthesis of ochratoxins A and B, metabolites of *Aspergillus ochraceus* Wilh. Tetrahedron Lett., 23, 4449-4461.
183. VAN DER MERWE (K.J.), STEYN (P.S.), FOURIE (L.), SCOTT (De.B.) and THERON (J.J.), 1965 - Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. Nature (Lond.), 205, 1112-1113.
184. MIROCHA (C.J.), PATHRE (S.W.) and CHRISTENSEN (C.M.), 1977 - Zearalenone. In : Rodricks J.V., Hesseltine C.W. and Mehlman M.A. ed. Mycotoxins in human and animal health, Park Forest South, IL, USA, Pathotox Publishers Inc., 345-364.
185. MIROCHA (C.J.) and CHRISTENSEN (C.M.), 1974 - Oestrogenic mycotoxins synthesized by *Fusarium*. In : Purchase, I.F.H. ed. Mycotoxins, Amsterdam, Elsevier, 129-148.
186. FILTENBORG (O.) and FRISVAD (J.C.), 1980 - A simple screening method for toxigenic moulds in pure cultures. Lebensm. Wiss. U. Technol., 13, 128-130.
187. BULLERMAN (L.B.), 1974 - A screening medium and method to detect several mycotoxins in mold cultures. J. Milk Food Technol., 37, 1, 1-3.
188. BARR (J.G.) and DOWNEY (G.A.), 1975 - A multiple inoculation technique for the screening of fungal isolates for the evaluation of growth and mycotoxin production on agar substrates. J. Sci. Fd Agric., 26, 1561-1566.
189. SCOTT (P.M.), LAWRENCE (J.W.) and VAN WALBEEK (W.), 1970 - Detection of mycotoxins by thin-layer chromatography : application to screening of fungal extracts. Appl. Microbiol., 20, 5, 839-842.
190. DEO (P.P.), GUPTA (J.S.), SINGH (S.) and GUPTA (P.), 1981 - Screening of aflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus* associated with stored seeds of lentil in agra. Acta Botanica Indica, 9, 331-334.
191. DAVIS (G.R.F.), SMITH (J.D.), SCHIEFER (B.) and LOEW (F.M.), 1975 - Screening for mycotoxins with larvae of *Tenebrio molitor*. J. Invertebr. Pathol., 26, 299-303.

192. ROMER (T.R.) and CAMPBELL (A.D.), 1976 - Collaborative study of a screening method for the detection of aflatoxins in mixed feeds, other agricultural products and foods. *J. Ass. Off. Anal. Chem.*, 59, 1, 110-127.
193. VELASCO (J.), 1968 - A simplified procedure for the determination of aflatoxin B₁ in cottonseed meals. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 46, 105-107.
194. VOSDINGH (R.A.) and NEFF (M.J.C.), 1974 - Bioassay of aflatoxins by catfish cell cultures. *Toxicology*, 2, 107-112.
195. JACQUET (J.) et BOUTIBONNES (P.), Juin 1970 - Action des flavacoumarines (aflatoxines) sur les petits crustacés d'eau douce. Possibilité de création d'un test biologique. *Bull. Acad. Vet. Vigot Frères Ed.*, T.XLIII, 299-309.
196. CLEMENTS (N.L.), 1968 - Rapid confirmatory test for aflatoxin B₁, using *Bacillus megaterium*. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 51, 1192-1194.
197. NESHEIM (S.) - In : "Thin layer chromatography, quantitative environmental and clinical applications". edited by J.C. Touchstone and D. Rogers, J. Wiley and Sons, New-York, 1980.
198. JACOBSON (W.C.), HARMEYER (W.C.) and WISEMAN (H.G.), 1971 - Determination of aflatoxins B₁ and M₁ in milk. *J. Dairy Sci.*, 54, 21-24.
199. JEMMALI (M.) and MURTHY (T.R.K.), 1976 - A chemical assay method for the determination of aflatoxin residues in animal tissues. *Z. Lebensm. Unter. Forsch.*, 161, 1, 13-17.
200. TRUCKSESS (M.W.) and STOLOFF (L.), 1979 - Extraction, cleanup and quantitative determination of aflatoxins B₁ and M₁ in beef liver. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 62, 5, 1080-1082.
201. VAN EGMOND (H.P.), PAULSCH (W.E.), SIZOO (E.A.) and SCHULLER (P.L.), 1979 - Fourth International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phytotoxins, Lausanne, Switzerland, Abstr.
202. STUBBLEFIELD (R.D.) and SHOTWELL (O.L.), 1981 - Determination of aflatoxins in animal tissues. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 64, 4, 964-968.
203. JOSEFSSON (B.G.E.) and MÖLLER (T.E.), 1977 - Screening method for the detection of aflatoxins, ochratoxin, patulin, sterigmatocystin and zearalenone in cereals. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 60, 6, 1369-1371.

204. SEITZ (L.M.) and MOHR (H.E.), 1976 - Simple method for simultaneous detection of aflatoxin and zearalenone in corn. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 59, 1, 106-109.
205. HAGAN (S.N.) and TIETJEN (W.H.), 1975 - A convenient thin layer chromatographic cleanup procedure for screening several mycotoxins in oils. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 58, 3, 620-621.
206. BALZER (I.), BOGDANIC (C.) and PEPELJNJAK (S.), 1978 - Rapid thin layer chromatographic method for determining aflatoxin B₁, ochratoxin A and zearalenone in corn. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 61, 3, 584-585.
207. STOLOFF (L.), NESHEIM (S.), YIN (L.), RODRICKS (J.V.), STACK (M.) and CAMPBELL (A.D.), 1971 - A multimycotoxin detection method for aflatoxins, ochratoxins, zearalenone, sterigmatocystin and patulin. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 54, 1, 91-97.
208. ANDRELLOS (P.J.) and REID (G.R.), 1964 - Confirmatory test for aflatoxin B₁. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 47, 801-803.
209. CRISAN (E.V.) and GREFIG (A.T.), 1967 - The formation of aflatoxin derivatives. *Contrib. Boyce Thompson Inst.*, 24, 1, 3-8.
210. STEYN (P.S.), 1969 - The separation and detection of several mycotoxins by thin layer chromatography. *J. Chromatogr.*, 45, 473-475.
211. "Official Methods of Analysis", Chapter 26, 13th Edn; Revised March 1980, Assoc. Off. Anal. Chem., Arlington, VA, 1980.
212. WILEY (W.), WAISS (A.C.) and BENNETT (N.), 1969 - Reaction of aflatoxin B₁ with acetic acid-thionyl chloride. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 52, 75-76.
213. POHLAND (A.E.), YIN (L.) and DANTZMAN (J.G.), 1970 - Rapid chemical confirmatory method for aflatoxin B₁. I. Development of the method. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 53, 1, 101-102.
214. MUECKE (W.) and KIERMEIER (F.), 1971 - Spray reagent for the detection of aflatoxins. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 146, 6, 329-331.
215. NAGARAJAN (V.), BHAT (R.V.) and TULPULE (P.G.), 1973 - Aflatoxin-like factor in tapioca. *Environ. Physiol. Biochem.*, 3, 1, 13-18.
216. KIERMEIER (F.) and MUECKE (W.), 1973 - Bestimmung von aflatoxin M₁ und M₂ in milch. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 152, 1, 18-24.

217. WAKELYN (P.J.), 1974 - Derivative method for chemical confirmation of the identity of aflatoxin B. Anal. Chim. Acta, 69, 481-483.
218. STACK (M.E.), POWLAND (A.E.), DANTZMAN (J.G.) and NESHEIM (S.), 1972 - Derivative method for chemical confirmation of identity of aflatoxin M₁. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 55, 313-314.
219. PRZYBYLSKI (W.), 1975 - Formation of aflatoxin derivatives on thin layer chromatographic plates. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 58, 163-164.
220. ASHOOR (S.H.) and CHU (F.S.), 1975 - Reduction of aflatoxins B₁ and B₂ with sodium borohydride. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 58, 3, 492-496.
221. TRUCKSESS (M.W.), 1976 - Derivatization procedure for identification of aflatoxin M₁ on a thin layer chromatogram. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 59, 3, 722-723.
222. VAN EGMOND (H.P.), PAULSCH (W.E.) and SCHULLER (P.L.), 1978 - Confirmatory test for aflatoxin M₁ on a thin layer plate. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 61, 4, 809-812.
223. STUBBLEFIELD (R.D.), VAN EGMOND (H.P.), PAULSCH (E.W.) and SCHULLER (P.L.), 1980 - Determination and confirmation identity of aflatoxin M₁ in dairy products : Collaborative study. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 63, 4, 907-921.
224. VAN EGMOND (H.P.) and STUBBLEFIELD (R.D.), 1981 - Improved method for confirmation of identity of aflatoxins B₁ and M₁ in dairy products and animal tissue extracts. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 64, 1, 152-155.
225. DAVIS (N.D.) and DIENER (U.L.), 1980 - Confirmatory test for the high pressure liquid chromatographic determination of aflatoxin B₁. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 63, 1, 107-109.
226. BEEBE (R.M.) and TAKAHASHI (D.M.), 1980 - Determination of aflatoxin M₁ by high-pressure liquid chromatography using fluorescence detection. J. Agric. Food Chem., 28, 2, 481-482.
227. DURACKOVA (Z.), BETINA (V.) and NEMEL (P.), 1976 - Systematic analysis of mycotoxins by thin layer chromatography. J. Chromatogr., 116, 141-154.
228. PONS (W.A.) and FRANZ (A.O.), 1978 - High pressure liquid chromatographic determination of aflatoxins in peanut products. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 61, 4, 793-800.

229. FRITZ (W.), ENGST (R.) and KRUG (G.), 1977 - Problems concerning mycotoxin determination. Zesz. Probl. Postepow Nauk Roln, 189, 285-290.
230. BENCZE (K.) and KIERMEIER (F.), 1972 - Zur infrarotspektroskopie der Aflatoxine. Z. Lebensmittel-Unters. U. Forsch., Dtch., 148, 4, 211-214.
231. GALLAGHER (R.T.) and STAHR (H.M.), 1980 - Identification of a potential interference in the analysis of aflatoxin 2,4-methyl-6-éthoxyquinoline, a reaction product of ethoxyquin. J. Agric. Food Chem., 28, 1, 133-135.
232. KIERMEIER (F.), MILLER (M.), WEISS (G.) and BEHRINGER (G.), 1978 - Possibilities of interference in the identification of aflatoxin M₁. Z. Lebensm. Unters. Forsch., 166, 5, 274-279.
233. NESHEIM (S.) and BRUMLEY (W.C.), 1981 - Recd 1982 - Confirmation of identity of aflatoxins. J. Am. Oil. Chem. Soc., 58, 12, 945A-949A.
234. CARNAGHAN (R.B.A.), 1963 - Toxicity and fluorescence properties of the aflatoxins. Nature (London), 200, 1001.
235. Anonymous, 1975 - In W. Horwitz (Ed.): Official Methods of Analysis, 12th ed. Soc. Off. Anal. Chem., Washington, D.C., Sects. 26.073-26078, 473-475.
236. TOWNSLEY (P.M.) and LEE (E.G.H.), 1967 - Response of fertilized eggs of the mollusk *Bankia setacea* to aflatoxin. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 50, 361.
237. BROWN (R.F.), WILDMAN (J.) and EPPLEY (R.M.), 1968 - Temperature-dose relationships with aflatoxin on the brine shrimp, *Artenia salina*. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 51, 905-906.
238. GABLIKS (J.), SCHAEFFER (W.), FRIEDMAN (L.) and WOGAN (G.N.), 1965 - Effect of aflatoxin B₁ on cell cultures. J. Bacteriol., 90, 720-723.
239. SLOWATIZKY (I.), MAYER (A.M.) and POLJAKOFF-MAYBER (A.), 1969 - The effect of aflatoxin on greening of etiolated leaves. *Israël J. Bot.*, 18, 31.
240. ABEDI (Z.H.) and SCOTT (P.M.), 1969 - Detection of toxicity of aflatoxins, sterigmatocystin and other fungal toxins by lethal action of Zebra fish larvae. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 52, 963-969.
241. BROCE (D.), GRODNER (R.M.), KILLEBREW (R.L.) and BONNER (F.L.), 1970 - Ochratoxins A and B confirmation by microbiological assay using *Bacillus cereus mycooides*. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 53, 616-619.

242. CHOUDHURY (H.) and CARLSON (C.W.), 1973 - The lethal dose of ochratoxin for chick embryos. *Poult. Sci.*, 52, 1202-1203.
243. HARWIG (J.) and SCOTT (P.M.), 1971 - Brine shrimp (*Artemisia salina* L.) larvae as a screening system for fungal toxins. *Appl. Microbiol.*, 21, 1011-1016.
244. NATORI (S.), SAKAKI (S.), KURATA (H.), UDAGAWA (S.), ICHINOE (M.), SAITO (M.) and UMEDA (M.), 1970 - Chemical and cytotoxicity survey on the production of ochratoxins and penicillic acid by *Aspergillus ochraceus* Wihl. *Chem. Pharm. Bull.*, 18, 2259-2268.
245. MIROCHA (C.J.), PATHRE (S.V.) and CHRISTENSEN (C.M.), 1974 - In : Wyllie T.D. and Morehouse L.G. Eds. *Mycotoxic Fungi, Mycotoxins, Mycotoxicoses*. Marcel Dekker Inc., Vol. 1, 366-383 and 412-420.
246. CHUNG (C.W.), TRICKSESS (M.W.), GILES (A.L.), FRIEDMAN (Jr. and L.), 1974 - Rabbit skin test for estimation of T-2 toxin and other skin-irritating toxins in contaminated corn. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 57, 1121-1127.
247. HORWITZ (W.), SENZEL (A.), REYNOLDS (M.) and PARK (D.L.) ed., 1975 - Natural poisons. In : Chapter 26, *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, Washington, DC, Assoc. Off. Anal. Chem., 462-484.
248. ISSAQ (H.J.) and CUTCHIN (W.), 1981 - A guide to thin layer chromatographic systems for the separation of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂. *J. Liquid Chromatography*, 4, 6, 1087-1096.
249. JONES (B.D.), 1977 - In : Wyllie T.D. and Morehouse L.G. Eds. *Mycotoxic fungi, mycotoxins, mycotoxicoses*. Marcel Dekker Inc. Vol. 1, 201-237.
250. MANABE (M.) and MATSUURA (S.), 1971 - Liquid chromatography of aflatoxins including aflatoxins B_{2a} et G_{2a}. *Agr. Biol. Chem.*, 35, 3, 417-423.
251. HUNT (D.C.), BOURDON (A.T.) WILD (P.J.) and CROSBY (N.T.), 1978 - Use of high performance liquid chromatography combined with fluorescence detection for the identification and estimation of aflatoxins and ochratoxin in food. *J. Sci. Fd Agric.*, 29, 234-238.
252. GARNER (R.C.), 1975 - Aflatoxin separation by high-pressure liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 103, 186-188.

253. GOTO (T.), MANABE (M.) and MATSUURA (S.), 1979 - Application of high performance liquid chromatography to the analysis of aflatoxins in foods and feeds. Preparation of sample and column. *Agric. Biol. Chem.*, 43, 12, 2591-2592.
254. KNUTTI (R.), BALSIGER (Ch.) and SUTTER (K.), 1979 - Routine application of HPLC for quantification of aflatoxins in whole peanut kernels. *Chromatographia*, 12, 6, 349-353.
255. NESHEIM (S.), 1976 - The ochratoxins and other related compounds. In : Rodricks J.V. ed. *Mycotoxins and other fungal related food problems*, Washington, DC, Amer. Chem. Soc., 276-295 (Advances in Chemistry Series 149).
256. NESHEIM (S.), HARDIN (N.F.), FRANCIS (O.J.Jr.) and LANGHAM (W.S.), 1973 - Analysis of ochratoxins A and B and their esters in barley, using partition and thin layer chromatography. I. Development of the method. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 56, 817-821.
257. LEE (L.S.) and SKAU (D.B.), 1981 - Thin layer chromatographic analysis of mycotoxins : a review of recent literature. *J. Liquid Chromatogr.*, 4, (Suppl. 1), 43-62.
258. SCOTT (P.M.), 1977 - In : Wyllie T.D. and Morehouse L.G. Eds, *Mycotoxic fungi, mycotoxins, mycotoxicoses*. Marcel Dekker Inc., Vol. 1, 286-287.
259. MIROCHA (C.J.), SCHAUERHAMER (B.) and PATHRE (S.V.), 1974 - Isolation, detection and quantification of zearalenone in maize and barley. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 75, 1104-1110.
260. HELME (J.P.) and JUILLET (M. Th.), 1974 - *Rev. Franç. Diététique*, 18 Fasc., 70, 49-55.
261. BUTLER (W.H.), 1964 - Acute toxicity of aflatoxin B₁ in rats. *Br. J. Cancer*, 18, 756-762.
262. WOGAN (G.N.), EDWARDS (G.S.) and NEWBERNE (P.M.), 1971 - Structure-activity relationships intoxicity and carcinogenicity of aflatoxins and analogs. *Cancer Res.*, 31, 1936-1942.
263. WONG (J.J.) and HSIEH (D.P.H.), 1976 - Mutagenicity of aflatoxins related to their metabolism and carcinogenic potential. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 73, 2241-2244.

264. AMES (B.N.), DURSTON (W.E.), YAMASAKI (E.) and LEE (F.D.), 1973 - Carcinogens are mutagens : A simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70, 2281-2285.
265. EL-ZAWAHRI (M.), MOUBASHER (A.), MORAD (M.) and EL-KADY (I.), 1977 - Mutagenic effect of aflatoxin B₁. Ann. Nutr. Alim., 31, 859-866.
266. CILIEVICI (O.), CORDOS (I.), GHIDUS (E.) and MOLDOVAN (A.), 1980 - The toxic and teratogenic effect of aflatoxin B₁ on chick embryo development. Rev. Roum. Morphol. Embryol. Physiol. Morph. Embryol., 26, 4, 309-314.
267. CILIEVICI (O.), MOLDOVAN (A.) and GHIDUS (E.), 1980 - Recd. 1981 - Action of aflatoxin B₁ on pregnant rats. Rev. Roum. Morphol. Embryol. Physiol. Morphol. Embryol., 26, 2, 125-132.
268. SCHMIDT (R.E.) and PANCIERA (R.S.), 1980 - Effets on aflatoxin on pregnant and hamsters fetuses. J. Comp. Pathol., 90, 3, 339-348.
269. MOULE (Y.), Mai 1975 - "Mécanisme d'action de l'aflatoxine B₁ sur la transcription". In : Biquet J. and Jemmali M. Les Mycotoxines, Paris, Ed. INSERM, 46, 93-102.
270. YU, FU-LI, 1981 - Mechanism of aflatoxin B₁ inhibition of rat liver nucleolar RNA synthesis. J. Biol. Chem., 256, 7, 3292-3297.
271. NIRANJAN (B.G.), BHAT (N.K.) and AVADHANI (N.G.), 1982 - Preferential attack of mitochondrial DNA by aflatoxin B₁ during hepatocarcinogenesis. Science (Wash. DC), 215, 4528, 73-75.
272. BHAT (N.K.), NARAYAN (K.), EMEH (J.K.), NIRANJAN (B.G.) and AVADHANI (N.G.), 1982 - Inhibition of mitochondrial protein synthesis during early stages of aflatoxin B₁ - induced hepatocarcinogenesis. Cancer Res., 42, 5, 1876-1880.
273. PATTERSON (D.S.P.), 1977 - In : Wyllie T.D. and Morehouse L.G. Eds. Mycotoxic fungi, mycotoxins, mycotoxicoses. Marcel Dekker Inc., Vol. 1, 174-189.
274. OBIDAO, ONYECHI and ENYINNAYA E. OBONNA, 1981 - Aflatoxin inhibition of reversed electron transfert in rat liver mitochondria in vitro. Biochem. Med., 26, 1, 1-7.
275. PIER (A.C.), FITCHNER (R.E.) and CYSEWSKI (S.J.) - Effects of aflatoxins on the cellular immune system. Ann. Nutr. Alim., 1977, 31, 781-788.

276. RUTLEDGE (A.E.), 1977 - The public health significance of mycotoxins. *Ann. Nutr. Alim.*, 31, 1019-1030.
277. MOULE (Y.), 1977 - Mécanisme d'action des mycotoxines. *Ann. Nutr. Alim.*, 31, 803-810.
278. PEERS (F.G.) and LINSELL (C.A.), 1977 - Dietary aflatoxins and human primary liver cancer. *Ann. Nutr. Alim.*, 31, 1005-1008.
279. STORA (C.), 20 Mars 1978 - Cancérologie : "L'aflatoxine est présente dans des cancers primitifs du foie développés chez des habitants du Zaïre". *C.R. Acad. Sc. Paris, T. 286, Série D*, 917-920.
280. PHILLIPS (D.L.), YOURTEE (D.M.) and SEARLE (S.), 1976 - Presence of aflatoxin B₁ in human liver in United States. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 36, 403-406.
281. REYE (R.D.K.), MARGAN (G.) and BARAL (J.), 1963 - Encephalopathy and fatty degeneration of the viscera : A disease entity in childhood. *Lancet*, 2, 749-752.
282. DVORACKOVA (I.), KUSAK (V.), VESELY (D.), VESELA (J.) and NESNIDAL (P.), 1977 - Aflatoxin and encephalopathy with fatty degeneration of viscera (Reye). *Ann. Nutr. Alim.*, 31, 977-990.
283. NGINDU (A.), KENYA (P.R.), OCHENG (D.M.), OMONDI (T.N.), NGARE (W.), GATEI (D.), JOHNSON (B.K.), NGIRA (J.A.), ANADWA (H.) et al., 1982 - Outbreak of acute hepatitis caused by aflatoxin poisoning in Kenya. *Lancet*, 1, 8285, 1346-1348.
284. DVORACKOVA (I.), STORA (C.) and AYRAUD (N.), 1981 - Evidence for aflatoxin B₁ in 2 cases of lung cancer in man. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 100, 2, 221-224.
285. DVORACKOVA (I.), 1976 - Aflatoxin inhalation and alveolar cell carcinoma. *Br. Med. J.*, 20, 691.
286. VESELA (D.), VESELY (D.), JELINEK (R.), Jan. 1983 - Toxic effects of ochratoxin A and citrinin, alone in combination, on chicken embryos. *Appl. Environm. Microbiol.*, 45, 1, 91-93.
287. ARORA (R.G.) and FROLEN (H.), 1981 - Interference of mycotoxins with prenatal development of the mouse. 2. Ochratoxin A induced teratogenic effects in relation to the dose and stage of gestation. *Acta Vet. Scand.*, 22, 3/4, 535-552.

288. SCOTT (P.M.), 1977 - In : Wyllie T.D. and Morehouse L.G. Eds. Mycotoxic Fungi, Mycotoxins, Mycotoxicoses. Marcel Dekker Inc., Vol. 1, 366-383 and 412-420.
289. MEISMER (H.) and CHAN (S.), 1974 - Ochratoxin A, an inhibitor of mitochondrial transport systems. Biochemistry, 13, 2795-2800.
290. HEPTINSTALL (R.H.), 1966 - Pathology of the kidney. London, Churchill, 457-464.
291. JOFFE (A.B.), 1977 - In : Wyllie T.D. and Morehouse L.G. Eds. Mycotoxic fungi, Mycotoxins, Mycotoxicoses. Marcel Dekker Inc., Vol. 3, 21-86.
292. STANFORD (G.K.), HOOD (R.D.) and HAYES (A.W.), 1975 - Effect of prenatal administration of T-2 toxin to mice. Res. Commun. Chem. Path. Pharmacol., 10, 743-746.
293. PIER (A.C.), RICHARD (J.L.) and CYSEWSKI (S.J.), 1980 - Implications of mycotoxins in animal disease. J. Amer. Vet. Med. Assoc., 176, 719-724.



DERNIERE PAGE D'UNE THESE

VU

GRENOBLE, le 3 novembre 1983

Le Président de la Thèse

Seppien

VU

GRENOBLE, le 21 novembre 1983

Le Président de l'Université
Scientifique et Médicale



L. Tanche

Le Président,
M. TANCHE

K R I V O B O K S E R G E

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES MYCOTOXINES (AFLATOXINES, OCHRATOXINES, ZEARALE-
NONE ET TRICHOHECENES).

THESE DE DOCTEUR EN PHARMACIE (diplôme d'état) GRENOBLE 1983

RESUME

Diverses moisissures produisent dans des conditions particulières des mycotoxines et cette étude bibliographique regroupe les principaux résultats obtenus durant ces vingt dernières années, au sujet des quatre groupes les plus importants de mycotoxines, les aflatoxines, les ochratoxines, la zéaralénone et les trichothécènes.

En partant des sources et de la présence dans l'environnement de ces toxines, ce travail traite le métabolisme de ces produits fongiques dans l'organisme animal en cas d'ingestion, conduisant à leurs effets toxiques aigus et chroniques, l'extrapolation de ces résultats chez l'homme étant discutée.

Les hypothèses les plus probables de la biosynthèse de ces mycotoxines sont présentées, de même que les facteurs environnementaux influençant cette synthèse, et particulièrement ceux en rapport avec la production des aflatoxines.

Du fait des faibles concentrations de ces toxines trouvées habituellement dans les denrées alimentaires, les principales méthodes de routine pour l'analyse et le dosage des mycotoxines sont exposées (TLC - bi TLC), de même que certaines méthodes récentes encore peu utilisées (HPTLC - HPLC - GLC).

Les risques qu'impliquent pour la santé humaine l'exposition à ces quatre catégories de mycotoxines, sont évalués, les aflatoxines faisant l'objet d'un examen particulièrement détaillé.

MOTS CLES : Mycotoxines - ~~Aflatoxines~~ - ~~Moisissures~~ - ~~Biosynthèse~~ -
~~Dosage~~.

JURY : Mme le Professeur F. SEIGLE-MURANDI Président
M. le Professeur J. LACHARME
M. le Professeur J. FAURE
M. le Professeur D. MARZIN

DATE DE LA SOUTENANCE : le 22 DECEMBRE 1983

ADRESSE DE L'AUTEUR : "La Marmade"
74410 SAINT JORIOZ