

Note sur la présence d'aflatoxine dans les fanes d'arachides

par R. BOUDERGUES, H. CALVET, E. DISCACCIATI et Mme M. CLICHE

RÉSUMÉ

Les fanes d'arachide constituent en pays arachidien et spécialement au Sénégal un aliment apprécié par les diverses espèces animales. Des recherches effectuées sur ce fourrage au Laboratoire National de l'Élevage et de Recherches Vétérinaires de Dakar, ont révélé la présence d'aflatoxine de toxicité comparable à celle trouvée dans la graine et les tourteaux d'arachide.

Les bovins d'expérience entretenus au Laboratoire national de l'Élevage et de Recherches vétérinaires de Dakar reçoivent traditionnellement comme nourriture de base, un fourrage constitué de fanes d'arachide. Ce même aliment entre dans le rationnement des animaux de laboratoire, lapins, cobayes élevés à la ferme annexe de Sangalkam.

Durant les années 1964-1965, la mortalité survenue sur des zébus et des taurins ndama, à la suite de troubles mal définis, suscite l'intérêt des diverses sections du Laboratoire. Les recherches de bactériologie, virologie, parasitologie, entreprises ne peuvent en élucider la cause.

Durant la même période, l'élevage de cobayes de Sangalkam est décimé par plusieurs enzooties meurtrières dont l'origine demeure également indéterminée.

La répétition de ces accidents et les lésions anatomo-pathologiques rencontrées font alors envisager l'existence possible d'un facteur toxique dans l'aliment distribué. Étant donné la nature de cet aliment, la fane d'arachide, l'étude s'oriente vers la recherche de l'aflatoxine.

Il convient de signaler que STARON et Collab. I. N. R. A., Path. vég. Versailles (5) ont isolé *Aspergillus ochraceus* à partir d'un foin stocké dans de mauvaises conditions et ayant provoqué la mort de trois génisses.

Les résultats de ces travaux préliminaires font l'objet de cette note et intéressent les points suivants :

— Extraction et dosage de l'aflatoxine sur :

- un échantillon moyen de paille,
- des échantillons de feuilles,
- des échantillons de tiges,
- des échantillons de coques.

— Contrôle de toxicité des extraits sur :

- caneton,
- œuf embryonné.

— Essais de culture de l'*Aspergillus* isolé de la paille.

I. — EXTRACTION ET DOSAGE PHYSICO-CHIMIQUE

Le dosage de l'aflatoxine est effectué selon la méthode préconisée par The Tropical Product Institute (2).

Les fanes d'arachide utilisées sont prélevées sur une livraison arrivant au Laboratoire pour être entreposée dans les greniers. Les feuilles, tiges, racines et coques de la plante *Arachis hypogea* sont broyées séparément au broyeur Gondard, ainsi qu'un échantillon moyen de paille totale.

50 g de broyat sont délipidés pendant 6 h en soxhlet par de l'éther de pétrole.

Le résidu desséché est traité durant 4 h par du méthanol, également en soxhlet.

L'extrait méthanolique, concentré à 50 ml, est agité avec 25 ml d'eau et 25 ml de chloro-

forme. La phase chloroformique est décantée et on extrait trois fois la phase méthanol par 25 ml de chloroforme.

Les phases chloroformiques sont réunies et amenées à un volume de 100 ml.

Chromatographie.

Les extraits sont chromatographiés sur Kieselgel G en même temps que des solutions témoins.

Solution témoin n° 1 (T₁).

Aflatoxine B en solution chloroformique,
1 microlitre = 0,000 1 γ d'aflatoxine.

Solution témoin n° 2 (T₂).

5 microlitres de T₂ contiennent 0,0003 γ d'aflatoxine B et 0,0003 γ d'aflatoxine G.

La solution T₂ est la dilution au 1/200^e de la solution obtenue en dissolvant dans 200 ml de chloroforme, 5,6 mg d'un mélange d'aflatoxine B et G (dosé par spectrophotométrie au T. P. I. Londres et contenant 44 p. 100 de B et 44 p. 100 de G).

Résultats qualitatifs.

On trouve en lumière U. V. deux taches fluorescentes :

- une bleu de Rf = 0,56,
- une vert jaune de Rf = 0,40.

Les pigments végétaux (chlorophylle, etc...) donnent des traînées et des spots rouges en U. V. et jaunes verdâtres en visible. En effectuant une première chromatographie avec du chloroforme, ces traînées peuvent être pratiquement éliminées et amenées à migrer avec le front du solvant.

Résultats quantitatifs.

	Aflatoxines	
	B	G
Echantillon moyen de paille	3 p. p. m.	6 p. p. m.
— — feuille	3	18
— — tige	0,6	0,9
— — coque	3	3

Notons la forte proportion d'aflatoxine G dans la paille et principalement dans les feuilles.

II. — CONTRÔLE DE TOXICITÉ DES EXTRAITS DE L'ÉCHANTILLON MOYEN

A. — Sur caneton

Préparation de l'extrait glucosé.

L'extrait chloroformique de la paille est mélangé à du glucose et évaporé à 60 °C en agitant jusqu'à obtention d'un produit pulvérulent. Ce granulé sec est mis en suspension dans la quantité nécessaire d'eau distillée pour obtenir par dose :

— Glucose	2 g
— Aflatoxine	80 γ
— Eau	5 ml

L'extrait chloroformique (P) contient :

- 6 γ d'aflatoxine B par ml,
- 12 γ d'aflatoxine G par ml.

La toxicité de l'aflatoxine G étant 3 fois moindre que celle de B, 8 ml de l'extrait P ont été utilisés par dose caneton.

La D. L. 50 sur les canetons de 3 jours utilisés au Laboratoire National de l'Élevage à Dakar, se situe en effet aux environs de 80 μ g/jour (résultat de plusieurs essais de toxicité effectués).

Résultats.

	Mort
1 lot témoin de 8 canetons recevant du glucose	1 (gavage)
1 lot traité de 8 canetons recevant du glucose + aflatoxine	6

B. — Sur œuf embryonné

Préparation de l'extrait injecté.

L'extrait chloroformique P est passé sur colonne d'alumine basique (*).

Une première élution par du chloroforme élimine la chlorophylle. Une deuxième élution par du méthanol-chloroforme puis du méthanol donne un extrait incolore P₁ contenant les aflatoxines B et G. Des dosages chromatographiques sur plaque Kieselgel G montrent que les afla-

(*) Prolabo.

toxines B et G se retrouvent dans l'extrait P₁ qui est dépourvu de chlorophylle.

Les extraits P₁ sont évaporés et repris par du propylène glycol de façon à obtenir des solutions contenant :

- 0,025 γ d'aflatoxine dans 0,04 ml,
- 0,050 γ d'aflatoxine dans 0,04 ml.

Une partie des extraits P subit le même traitement afin de contrôler si la chlorophylle est toxique ou a une action sur la toxicité des aflatoxines.

La technique de VERRET et Coll. (4) a été adoptée. On injecte les extraits à tester dans la poche à air des œufs.

Résultats.

		Clairs	Morts	Morts/ Eclos
Lot 1	12 œufs témoins	3	1	1/9
Lot 2	12 œufs témoins percés	5	1	1/7
Lot 3	12 œufs témoins propylène glycol	6	0	0/6
Lot 4	12 œufs témoins chlorophylle	6	1	1/6
Lot 5	12 œufs témoins 0,025 γ d'aflatoxine B ₁	6	3	3/6
Lot 6	12 œufs témoins 0,050 γ d'aflatoxine B ₁	5	7	7/7
Lot 7	12 œufs extrait paille P ₁ à 0,025 γ	5	4	4/7
Lot 8	12 œufs extrait paille P ₁ à 0,050 γ	3	8	8/9
Lot 9	12 œufs extrait total P à 0,050 γ	6	5	5/6

Les extraits paille P et P₁ ont une toxicité pour l'œuf embryonné identique aux solutions témoins d'aflatoxine B₁. La chlorophylle n'a aucune action.

III. — ESSAIS DE CULTURE-ISOLEMENT DE LA SOUCHE

Des échantillons de paille sont mis en boîte de Pétri, stérilisés à 110 °C pendant vingt minutes, humidifiés à 20 p. 100 en poids et étuvés à 30 °C ± 1 °C en atmosphère saturée d'eau pendant 10 jours. Il se développe un mycélium, blanchâtre les premiers jours, virant au vert dès le troisième jour ; quelques spores sont repiquées sur gélose inclinée de Brian et mises à l'étuve.

À partir de ces souches sur gélose, des arachides broyées sont ensemencées selon la technique décrite dans le rapport annuel du Laboratoire national de l'Élevage de Dakar, année 1964.

Le dosage physico-chimique des tourteaux d'arachide obtenus, a donné un taux d'aflatoxine B₁ de 150 p. p. m. et d'aflatoxine G₁ de 130 p. p. m.

Un deuxième passage sur arachides broyées est effectué à partir de la culture précédente. Le taux d'aflatoxine B₁ est alors de 250 p. p. m., celui d'aflatoxine G₁ de 20 p. p. m.

La souche « paille » différente à l'origine s'adapte donc au nouveau milieu de culture constitué par des arachides broyées et les aflatoxines sont retrouvées dans les proportions habituellement obtenues sur ce milieu.

Les essais sur œuf embryonné de ces extraits d'arachide confirment la toxicité de l'aflatoxine provenant de la souche isolée de la paille d'arachide.

CONTAMINATION DES GRENIERS A FOURRAGE

Les greniers à fourrage ayant contenu d'importantes quantités de cette paille d'arachide pendant une saison correspondant aux conditions climatiques d'humidité et de température favorables au développement de l'*Aspergillus*, des essais sont tentés pour mettre en évidence la contamination éventuelle de ces locaux.

Après évacuation de toute la paille d'arachide et un nettoyage sommaire du sol, des échantillons de paille de riz, de foin de prairie de France et d'arachide sont entreposés durant deux mois. Les arachides sont broyées, mises en boîte de Pétri, stérilisées et réhumidifiées ; deux boîtes sont posées sur le sol, deux boîtes témoins mises à l'étuve.

Il faut souligner que les conditions climatiques d'humidité et de température étaient alors moins propices que pendant le stockage de la paille d'arachide.

Ces échantillons repris, stérilisés, humidifiés et mis en étuve à 30 °C ± 1 °C en atmosphère saturée d'eau, amènent le développement d'un mycélium vert à partir de l'arachide broyée. Aucune moisissure ne se développe sur les échantillons de paille ainsi que sur les arachides témoins mises à l'étuve.

La contamination des greniers à fourrage paraît donc probable mais le développement de l'*Aspergillus* demande un milieu et des conditions de température et d'humidité particulières.

CONCLUSION

L'aflatoxine, métabolite de *Aspergillus flavus*, est donc susceptible de se trouver dans les fanes d'arachide, aliment traditionnel du bétail au Sénégal.

Le champignon peut contaminer les locaux de stockage de ces fanes.

Dans le lot examiné, entreposé certainement dans des conditions exceptionnellement mauvaises, le taux du toxique s'avère très élevé. Un bovin consommant couramment de 4 à 5 kg de ce fourrage absorbe donc 12 à 15 mg d'aflatoxine B₁. Les tests effectués sur canetons et sur œufs embryonnés montrent que la toxicité de « l'aflatoxine paille » est comparable à celle obtenue sur arachides ensemencées par l'*Aspergillus flavus*.

Les susceptibilités individuelles mises en évidence dans l'expérimentation sur la vache laitière (1) peuvent expliquer que les accidents survenus sur les bovins, au Laboratoire, aient conservé un caractère sporadique. Mais cette expérimentation semble avoir mis en lumière un autre fait important.

En effet, les taux d'aflatoxine et la nature même de cette aflatoxine sont très différents suivant les diverses parties de la plante. Ce phénomène est difficilement explicable par une contamination

survenue pendant le séchage des fanes, après leur arrachage. On est donc amené à envisager la possibilité d'une invasion de l'arachide par le champignon, durant son cycle végétatif. La concentration du métabolite de l'*Aspergillus flavus* se faisant dans certaines parties de la plante, dans les feuilles par exemple, comme le montrent les analyses.

Cette hypothèse peut trouver une confirmation dans les résultats analytiques obtenus à la faveur de l'expérimentation agricole sur l'aflatoxine 1964-65 (EXAGRAF I).

En effet, au cours de cette campagne, exécutée sous l'égide de l'UNICEF en vue d'obtenir pour l'alimentation humaine des farines d'arachide exemptes d'aflatoxine, des analyses physico-chimiques ont porté sur un certain nombre d'échantillons d'arachide.

Ces échantillons de graine provenaient d'arachides séchées suivant plusieurs procédés. L'innovation essentielle portait sur l'utilisation d'un engin servant à déshydrater l'arachide en totalité, dès arrachage.

Or, sur 46 échantillons provenant de ce dernier mode de séchage, 6 résultats furent positifs à un taux supérieur à 0,05 p. p. m., ce qui démontre la contamination possible de l'arachide avant l'arrachage.

*Institut d'Elevage et de Médecine vétérinaire
des Pays tropicaux
Maisons-Alfort
Laboratoire national de l'Elevage et de
Recherches vétérinaires
Dakar-Hann*

SUMMARY

Note on the presence of aflatoxin in groundnut's haulms

In countries where groundnut is grown and specially in Senegal, groundnut's haulm is a good food for various domestic animals.

Researchs made on this fodder at the Laboratoire National de l'Elevage et de Recherches vétérinaires in Dakar have shown the presence of aflatoxin whose toxicity is comparable to the toxicity evidenced in the groundnut's seed and cake.

RESUMEN

Nota sobre la presencia de aflatoxina en las hojarascas de los cacahuetes

En los países dónde crece el cacahuete, particularmente en Senegal, las hojarascas del cacahuete son un alimento gustado por varias especies animales. Durante las investigaciones efectuadas en el Laboratorio Nacional de la Ganadería y de las Investigaciones veterinarias de Dakar, se demostró en este pienso la presencia de aflatoxina cuya toxicidad se compara con la encontrada en el grano y en las tortas del cacahuete.

BIBLIOGRAPHIE

1. CALVET (H.), BOUDERGUES (R.), DISCACIATI (E.) et Mme CLICHE (M.). — **Effets de l'aflatoxine sur les bovins tropicaux.** A paraître dans *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*
2. TROPICAL PRODUCTS INSTITUTE. — **Une méthode de détection de l'aflatoxine dans les arachides et dans les dérivés des arachides (A method for the detection of aflatoxin in groundnuts and groundnuts products).** Report n° 30/62, 1962, Central Veterinary Laboratory Weybridge, London.
3. SARGEANT (K.), O'KELLY (J.), CARNAGHAN (R. B. A.) and ALLCROFT (R.). — **Essai du principe toxique de certaines farines d'arachides (The essay of a toxic principle in certain groundnut meals).** *Vet. Rec.*, 1961, 73 (46) : 1219-22.
4. VERRET (J.), MARLIAC (J. P.) and LAUGHIN (J.). — **Emploi d'embryon de poulets pour tester la toxicité de l'aflatoxine (Use of the chickens embryo in the assay of a aflatoxin toxicity).** *J. A. O. A. C.*, 1964, 47 (6) : 1003.
5. STARON (T.), ALLARD (C.), XUONG (N. D.), CHAMBRE (M. M.), GRABONSKI (H.) and KOLLMANN (A.). — **Isolement de trois substances à partir de jus de culture et du mycélium d'*Aspergillus ochraceus* (Isolation of three toxic substances from culture fluids and from the mycellium of *Aspergillus ochraceus*).** *Phytia. Phytopharm.*, 1956, 14 (2) : 73-79.