

AFLATOXINES

TOXIQUES REDOUTABLES DANS NOS ALIMENTS

Ilhame BOURAIS et Aziz AMINE

Laboratoire des analyses Chimiques et Biocapteurs, Faculté des Sciences et Techniques de Mohammedia
a.amine@univh2m.ac.ma, ilhame_b@yahoo.com

RESUME : Les aflatoxines sont des métabolites produits par des moisissures du genre *Aspergillus* et plus particulièrement *A. flavus* et *A. parasiticus* se développant sur différents produits alimentaires. Ainsi, on les trouve dans les céréales, le maïs, le riz et aussi dans les graines de coton, les épices et le lait. Ces mycotoxines sont connues pour leur grande toxicité et leurs effets mutagéniques, tératogéniques et carcinogéniques. C'est ainsi que de nombreux pays ont instauré une législation stricte quand aux quantités maximales admissibles des aflatoxines dans les aliments.

La protection contre d'éventuelles aflatoxicoses reste évidente. Seul le contrôle continu des aliments assure leur innocuité. Des techniques performantes et sensibles sont largement utilisées pour ces fins sécuritaires.

Mots Clés : Aflatoxines, toxicité, quantification, aliments

La contamination des aliments et des sols par les toxines est un phénomène connu de longue date. En effet, le déclin de certaines civilisations serait dû à des mycotoxicoses. Ce n'est qu'en 1960 que fut la découverte des mycotoxines, avec les premières mycotoxicoses produites en Grande Bretagne provoquant des pertes considérables dans des élevages de Dinde suite à des nécroses importantes du foie. Ces mortalités ont été produites par une famille de mycotoxines appelées aflatoxines.

Du grec *mycos* (champignon) et du latin *toxinum* (poison), le terme mycotoxine désigne des substances chimiques produites par des moisissures se



développant sur des denrées alimentaires. Ces métabolites sont produits par des moisissures et sont retrouvés dans un grand nombre de produits alimentaires surtout végétaux. Il s'agit de petites molécules peu solubles dans l'eau, difficilement dégradables par les organismes vivants et sont très stables à l'acidité et à la chaleur.

La toxicité des mycotoxines dépend de la molécule en cause, de la fréquence d'exposition et de la quantité absorbée. Certaines mycotoxines contenues dans la nourriture vont entraîner une intoxication aiguë avec apparition rapide des symptômes (diarrhées, convulsions, ...), alors que d'autres mycotoxines présentent

une toxicité chronique, avec des effets cumulatifs sur le long terme, pouvant induire des cancers ou des déficiences immunitaires.

LE SAVIEZ VOUS ?

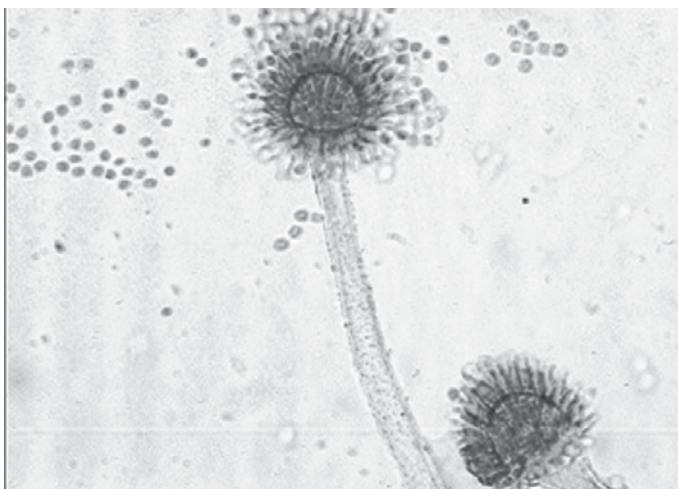
Selon l'Organisation mondiale de l'alimentation et de l'agriculture (FAO) plus de 25% des récoltes mondiales sont contaminés par des mycotoxines.

www.fao.org/documents

AFLATOXINES : MYCOTOXINES PARMIS D'AUTRES

Il y a environ 2500 mycotoxines répertoriées jusqu'à présent. Parmi les mycotoxines les plus rencontrées en agro-alimentaire on retrouve les ochratoxines, les fumonisines, les trichothécènes et les aflatoxines; les plus redoutables toxines dans les céréales et les fruits secs.

Les aflatoxines sont produites par *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* et rarement par *Aspergillus nomius*; champignons particulièrement favorisés dans un environnement chaud et humide.



CHAMPIGNON DU GENRE *ASPERGILLUS* EN ÉTAT DE SPORULATION
VU AU MICROSCOPE

En raison de la sévérité et de la diversité de leurs effets, la présence des mycotoxines dans les aliments est potentiellement dangereuse. De plus, leur grande stabilité thermique et leur résistance aux pH extrêmes fait que les moyens de détoxification ne sont pas encore très efficaces. Par ailleurs, il est plus adéquat de contrôler l'occurrence de ces composés toxiques dans les différents aliments où les champignons pourraient y trouver un milieu idéal pour leur prolifération.

La sécheresse ou l'humidité, la température, le milieu (nature du produit) sont des facteurs qui influencent la croissance des moisissures et la production des mycotoxines pendant la culture. Des conditions défectueuses après la récolte à savoir les conditions de stockage, de transformation et/ou de transport des produits alimentaires pourraient augmenter

de façon dramatique les teneurs en aflatoxines dans les aliments.

LES AFLATOXINES LES PLUS REDOUTABLES

Parmi une vingtaine des aflatoxines découvertes (AF), seules quatre (AFB_1 , AFB_2 , AFG_1 , AFG_2) sont des contaminants les plus viriles et les plus redoutés en alimentation humaine et animale. On trouve également les AFM, dont la plus connue est l' AFM_1 dérivé hydroxylé de l' AFB_1 qui constitue une forme d'excrétion dans le lait des mammifères.

Aspergillus flavus produit principalement l' AFB_1 et l' AFB_2 alors qu'*Aspergillus parasiticus* et *nomius* produisent les quatre aflatoxines.

Les conditions optimales pour la production des mycotoxines par les *Aspergillii* n'ont jamais pu être identifiées avec précision. Un degré d'humidité élevé (supérieur à 0.7) et une température de l'ordre de 30°C seraient favorables à la production des aflatoxines.

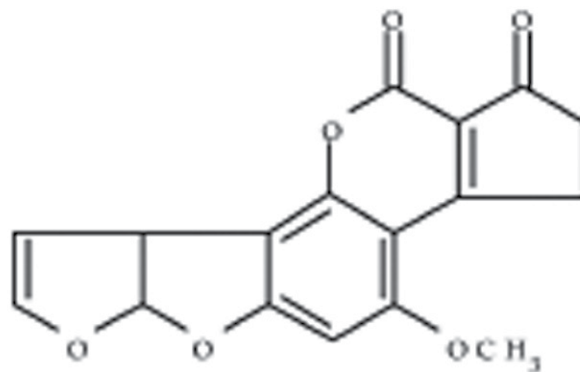
Les moisissures productrices des aflatoxines sont très répandues dans le monde entier; dans les pays à climat tempéré, subtropical et tropical. Les aflatoxines peuvent se trouver sur les aliments colonisés par les moisissures. Il peut s'agir de grains de céréales (maïs, riz, orge, blé), d'oléagineuses (tournesol, soja), des noix (pistaches, amandes, coco) et des épices (poivre, paprika, gingembre) ou encore dans le lait et les produits dérivés.

LE SAVIEZ VOUS ?

Les populations à risque d'exposition chronique aux aflatoxines s'estiment à plus d'un milliard d'individus en Inde et en Asie, environ 750 millions en Chine et en Afrique et à 500 millions d'individus en Amérique et les Caraïbes

TOXICITÉ DES AFLATOXINES

La structure des différentes aflatoxines est diversifiée ce qui explique leur différence de toxicité. Ainsi l'aflatoxine B_1 est la forme la plus toxique de toutes les autres aflatoxines. La toxicité des aflatoxines G_1 , B_2 et G_2 est respectivement 50, 80 et 90 % moindre que celle de l' AFB_1 .



STRUCTURE DE L'AFLATOXINE B_1 (AFB_1)

Les aflatoxines ont différentes propriétés toxiques ; mutagènes, carcinogènes et tératogènes.

L'agence internationale de recherche sur le cancer (IARC) a classé les aflatoxines dans la classe I des cancérogènes.

En cas de forte contamination, elles peuvent conduire à la mort.

En général le danger de ces mycotoxines réside lors d'une exposition chronique à de faibles doses.

La cible principale des aflatoxines est le foie. Une intoxication grave aux aflatoxines produit une nécrose hépatique et une hyperplasie biliaire.

L'AFB₁, l'aflatoxine la plus virile de toutes ces homologues, possède des propriétés immunosuppressives. Des réactivations parasitaires et la diminution de l'efficacité vaccinale ont été observées sur plusieurs espèces animales.

Cette toxine possède également des propriétés hématotoxiques caractérisées par des altérations de la moelle osseuse et également par la diminution de la synthèse des facteurs de coagulation et par des troubles de l'hémostase (dus à l'altération des fonctions hépatiques).

Dans les pays en voie de développement les études ont montré une grande synergie entre l'hépatite B (virus HBV) avec l'ingestion d'aflatoxine dans l'apparition du cancer du foie. Ainsi dans le cas d'une personne atteinte du virus HBV, l'aflatoxine est 30 % plus virile que chez une personne non atteinte par le virus et le risque relatif d'atteinte par le cancer de foie passe de 5 à 60 lorsque une aflatoxicose est combinée au virus HBV.

QUELQUES CHIFFRES

- La DL₅₀ est la dose létale 50 qui est relative à la quantité d'un composé capable de tuer 50 % des animaux en expérience

- Les effets des aflatoxines sur la santé animale varient suivant l'espèce. Ainsi pour l'AFB₁, la DL₅₀ varie de 0.3 mg/Kg de poids corporel pour le lapin à 17.9 mg/Kg pour la femelle du rat

- Les mâles sont plus sensibles aux aflatoxines que les femelles

Il est important de signaler que les aliments sont fréquemment contaminés par plusieurs moisissures capables de produire différentes toxines. C'est ainsi que des synergies entre les différentes mycotoxines libérées peuvent se produire. Toutefois, les associations entre les effets de ces métabolites sont jusqu'à présent mal documentées.

RISQUE D'AFLOATOXICOSE DANS LES PAYS EN VOIE DE DEVELOPPEMENT

La prévalence de l'exposition humaine aux aflatoxines dans les pays en voie de développement a été reportée récemment en chiffre. Ainsi environ 4.5 milliards de personnes sont exposées à des aliments dont la contamination par ces composés n'a pas été contrôlée.

Le Maroc est aussi concerné par cette problématique puisqu'il se situe dans la zone 40° Nord-Sud (longitudinal) qui regroupe les pays à haut risque de contamination.

QU'EN EST IL... ?

Bien que la contamination des aliments est peu étudiée au Maroc, les données reportées dans la littérature font apparaître une contamination des épices collectées sur le marché local.

LE SAVIEZ VOUS ?

- Les mycotoxines peuvent se retrouver dans l'air ambiant :

- des moulins

- des zones de déchargement des bateaux

- des ateliers où est préparé l'alimentation du bétail

- des moissonneuses, des camions lors du chargement ou aux silos

- Des associations entre cancer et exposition professionnelle à des mycotoxines ont été mises en évidence.

- Des *Aspergillii* capables de produire des toxines ont été isolées des poussières dans la ville de Taif en Arabie Saoudite.

REGLEMENTATION

La réglementation concernant les quantités maximales admissibles en aflatoxines varient d'un pays à l'autre, d'un produit alimentaire à l'autre et d'une aflatoxine à une autre.

Au Maroc, il n'existe toujours pas de normes concernant les limites des aflatoxines dans les aliments mais un projet de normes est en cours de réalisation par le service de normalisation industrielle marocaine (SNIMA).

La commission européenne a limité la teneur en aflatoxines totales (AFB₁+AFB₂+AFG₁+AFG₂) à 4 µg/Kg, l'AFB₁ seule à 2 µg/Kg dans les noix, les fruits secs, les céréales prêtes à la vente, et l'AFM₁ à 0.05 µg/Kg dans le lait. Pour les produits qui doivent subir un procédé industriel, la limite légale établie correspond à 8 µg/Kg et à 15 µg/Kg respectivement d'AFB₁ et des aflatoxines totales. Aux USA, les teneurs admissibles sont 5 fois plus grandes que celle établies en Europe.

Le métabolisme de l'AFB₁ libère l'AFM₁ dans le lait des mammifères. Leur pouvoir cancérogène puissant et leur présence dans l'alimentation pour bébés ont contribué à instaurer des limites très strictes (50 ng.L-1).

Teneurs maximales en aflatoxines dans quelques denrées alimentaires (Extrait du règlement (CE) n° 46/2001, Journal Officiel L77 du 16.3.2001, p. 1)

Produit	Teneurs maximales en aflatoxines µg/Kg		
	B ₁	B ₁ + B ₂ + G ₁ + G ₂	M ₁
Arachides, fruits à coques et fruits séchés	2	4	-
Céréales	2	4	-
Epices	5	10	-
Lait	-	-	0.05

Les moyens traditionnels adoptés pour prévenir les aflatoxicoses chroniques ou aiguës restent la mise à l'abri contre les aliments contenant ce type de toxiques. Cette approche préventive est assurée par le contrôle régulier des denrées alimentaires en faisant appel à des techniques sensibles pour la détection des aflatoxines à des concentrations infimes (ng/Kg).

TECHNIQUES D'ANALYSE

L'analyse des aflatoxines dans les denrées alimentaires passe en général à travers plusieurs étapes :

①

Echantillonnage et Préparation de l'échantillon (Broyage par exemple)

②

Extraction des aflatoxines par des solvants organiques adéquats

③

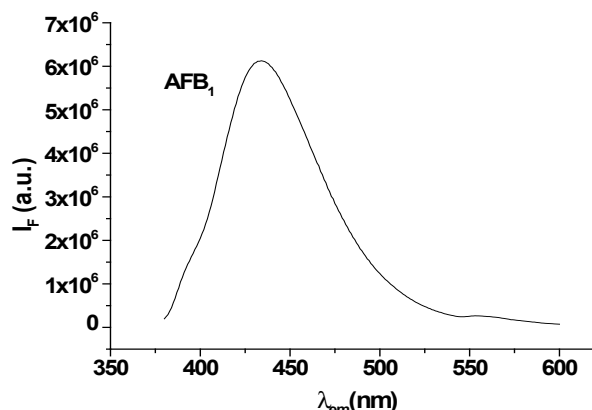
Purification de l'extrait aux colonnes d'extraction

④

Détection / Dosage

L'analyse proprement dite se fait par différentes techniques. Les techniques chromatographiques telles la CCM (Chromatographie en Couche Mince) ainsi que l'HPLC (Chromatographie Liquide à Haute Performance) représentent les techniques couramment utilisées pour le dosage des aflatoxines dans divers aliments. Ces techniques requièrent souvent des opérations de purification et de concentration de l'extrait avant l'opération finale de détermination de l'analyte en question. Dans d'autres cas, des colonnes de micro extraction sont utilisées dans l'étape de purification. Parmi ces colonnes on retrouve les colonnes d'immuno-affinité, les colonnes SPE (solid phase extraction) et les colonnes multifonctionnelles.

Les techniques chromatographiques utilisées pour la détermination des aflatoxines sont précédées par une opération dite de dérivation. Les réactions de dérivation font appel à des composés chimiques tels que l'acide trifluoracétique pour relever la fluorescence des aflatoxines afin d'améliorer la sensibilité de ces techniques.



SPECTRE DE FLUORESCENCE DE L'AFB₁ À UNE LONGUEUR D'ONDE D'EXCITATION $\lambda_{exc} = 350$ NM

La CCM reste une technique semi-quantitative simple et peu coûteuse pour l'analyse des aflatoxines et un moyen adéquat pour le contrôle des aliments surtout dans les pays en voie de développement.

Des techniques immunologiques sont aussi adoptées pour la détermination de ces mycotoxines dans de nombreux échantillons alimentaires. Ces techniques comprennent entre autres l'ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay).

Toutefois ce type de techniques souffre de problème de spécificité dû à la cross-réactivité des anticorps impliqués dans ces systèmes.

Les performances analytiques des différentes techniques citées ci-dessus varient largement en fonction de la matrice analysée (produit alimentaire), du type d'aflatoxine et certainement de la technique utilisée.

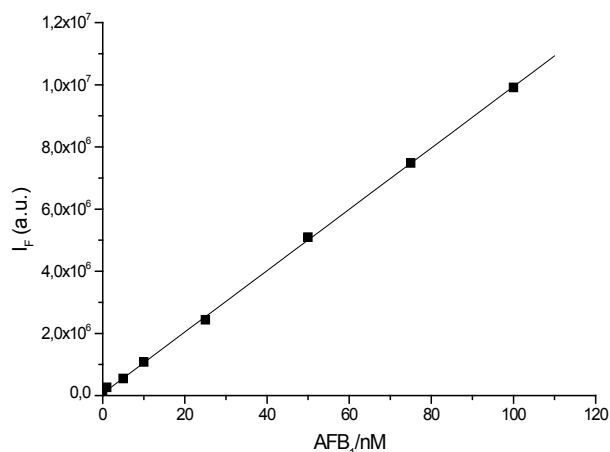
Ainsi, et dans le cas du maïs par exemple, l'HPLC permet de déterminer les aflatoxines totales dans un intervalle de 2-30 ng/g alors que l'ELISA permet de les quantifier au-delà de 30 ng/g (les deux techniques sont validées par l'Association des Chimistes Analystes "AOAC").

Citons aussi le cas d'une même technique, l'HPLC, où les aflatoxines totales sont quantifiées dans l'intervalle de 2,4-7,9 et 5-30 ng/g respectivement dans le paprika et les amandes.

Pour différentes aflatoxines contenues dans les pistaches, l'HPLC permet de déterminer l'AFB₁ et l'AFB₂ respectivement dans l'intervalle de 3-15 et 1-3 ng/g.

La quantification de tout composé nécessite l'élaboration de droite d'étalonnage en faisant appel à des standards contenant différentes concentrations du composé analysé.

Ci-dessous un exemple d'une courbe d'étalonnage de l'aflatoxine B₁ mesurée par simple fluorimétrie à une longueur d'onde d'excitation égale à 350nm.



COURBE DE CALIBRATION DE L'AFB₁ EN SOLUTION AQUEUSE

La prévention contre le danger que présente les mycotoxines et leurs produits de métabolisme ; les aflatoxines principalement, reste le contrôle des conditions de récolte, de transformation et du stockage des produits alimentaires.

La prévention comporte également un apport alimentaire riche en vitamines, en anti-oxydants et en composés connus pour leurs effets protecteurs contre la carcinogénèse.

RÉFÉRENCES

Microchimica Acta (2006) 153, 101-108: development and application of two-phase clean-up system in food samples prior to fluorescence analysis of aflatoxins.

Food Control (2006) 17(11), 868-874: Natural occurrence of mycotoxins in cereals and spices commercialized in Morocco.

Trends in Analytical Chemistry (2002) 21, 468-485: Validation of analytical methods for determining mycotoxins in foodstuffs.

The American Journal of Clinical Nutrition (2004) 80: 1106-1122: Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential consequences, and interventions.

Toxicology Letters (2002) 127, 19-28: Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe.

The American Journal of Clinical Nutrition (2004) 80: 1106-1122: Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology,

POUR EN SAVOIR PLUS

- Méthodes officielles d'analyse des aflatoxines : AOAC Official Methods of Analysis (1995) Natural Toxins. Chapter 49 / Supplement March 1996.

- Le site Web de l'AOAC, spécialement sur le lien <http://www.aoac.org/testkits/kits-toxins.HTM>, présente une base de données sur les différents kits et les colonnes d'extractions utilisés dans l'analyse des aflatoxines, notamment les kit-tests ELISA, dont certains sont approuvés par l'AOAC. Des liens hypertextes vont vous conduire aux sites Web des fournisseurs des kits recherchés.

Parmi les kits listés sur cette base de donnée, on retrouve le kit ELISA AgraQuant® qui est utilisé pour l'analyse des aflatoxines totales dans un intervalle de concentration de 1 à 20 ppb.

- D'autres informations sur les aflatoxines sont disponibles sur le site : www.aflatoxin.info

Ce site présente des travaux réalisés sur les aflatoxines, des chiffres de la contamination de certains produits alimentaires dans certains pays ainsi que d'autres informations utiles.

Le plus fascinant dans ce site réside dans certaines informations qui sont présentées en différentes langues notamment en anglais, en français et en indou.

- Les différentes aflatoxines se trouvent sous forme de lyophilisats ou en solution et sont fournis par plusieurs firmes dont voici certains disponibles sur le net :

- www.sigmaaldrich.com

- www.axxora.com/

- www.axxora.com/

- www.romerlabs.com/pdts_standards.html

PASFO
LA PASSION DE L'INFORMATIQUE ET DE LA BUREAUTIQUE

Conseil, Formation et Vente du Matériel
et Fourniture Informatique Technique et Electronique
Impression & Sérigraphie

Tél : 022.98.50.94 - Fax : 022.98.50.63
E-mail : pasfo@hotmail.com - GSM : 061.17.82.61 / 063.43.92.15