

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD LYON I

FACULTÉ DE PHARMACIE

1982 — N° 11

CONSEIL AFRICAINE ET MALGACHE
POUR L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR
C. A. M. E. S. — OUAGADOUGOU
Arrivée 26 JUIL 1995
Enregistré sous n° 000369

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement le **15 novembre 1982**

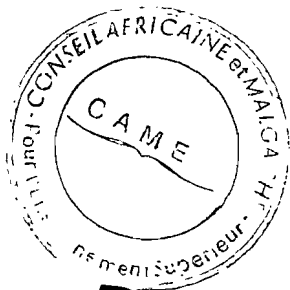
pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE 3^{ème} CYCLE DANS LES DISCIPLINES
PHARMACEUTIQUES (Toxicologie)

par

Sébastien D. DANO

Né en 1954 à Brékoua - Gagnoa



Dosage de l'Aflatoxine M₁ dans le lait et les produits laitiers.

JURY

MM CHAMBON , Professeur..... Président
PINATEL , Professeur.....
VALLON , Professeur..... } membres
ODDOUX , Professeur..... }

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD LYON I

PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ : Professeur L. DAVID
PREMIER VICE-PRESIDENT : Professeur R. MORNEX
DEUXIÈME VICE-PRESIDENT : Madame A. VARAGNAT
SECRETARE GENERAL : Monsieur F. MARIANI

UNITES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE DE L'UNIVERSITE

<u>MEDECINE</u>	(Grange-Blanche) (Alexis-Carré) (Lyon-Sud) (Lyon-Nord)	Directeur Directeur Directeur Directeur	Professeur ZECH P. Professeur MORNEX R. Professeur NORMAND J. Docteur MINAIRE Y. (M.C.A.)
<u>BIOLOGIE HUMAINE</u>		Directeur	Docteur REVILLARD J.P. (M.C.A.)
<u>TECHNIQUES DE READAPTATION</u>		Directeur	Professeur MORGON A.
<u>SCIENCES PHARMACEUTIQUES</u>		Directeur	Professeur BIZOLLON CH.A.
<u>SCIENCES ODONTOLOGIQUES</u>		Directeur	Professeur PARRET J.
<u>INSTITUT REGIONAL D'EDUCATION PHYSIQUE ET SPORTIVE</u>		Directeur	Monsieur MILLON A.
<u>MATHEMATIQUES</u>		Directeur	Professeur FLAMANT M.
<u>PHYSIQUE</u>		Directeur	Professeur DELMAU J.
<u>CHIMIE ET BIOCHIMIE</u>		Directeur	Madame VARAGNAT A.
<u>SCIENCES DE LA NATURE</u>		Directeur	Professeur LEMOIGNE Y.
<u>SCIENCES PHYSIOLOGIQUES</u>		Directeur	Mademoiselle Ie Professeur WORBE J.F.
<u>I.U.T. N° 1</u>		Directeur	Professeur VILLE A.
<u>I.U.T. N° 2</u>		Directeur	Monsieur GALLET J (Directeur E.N.S.A.M.)
<u>OBSERVATOIRE</u>		Directeur	Monsieur MONNET G (Astronome Adjoint)
<u>PHYSIQUE NUCLEAIRE</u>		Directeur	Professeur GUSAKOW M.
<u>MECANIQUE</u>		Directeur	Mademoiselle Ie Professeur COMTE-BELLOT G.

A MA FAMILLE

FEU MON PERE

MA MERE

MES FRERES ET SOEURS

MA FEMME

MA FILLE (MON COCO)

A MES BEAUX PARENTS

A TOUS MES AMIS

AU PRÉSIDENT DU JURY

Monsieur le Professeur CHAMBON

Je voudrais rendre hommage à la disponibilité sans faille et à la volonté dont vous avez toujours fait montre à mon égard, depuis que vous m'avez accueilli dans votre laboratoire.

Votre sympathie et vos conseils m'ont été précieux.

AUX MEMBRES DU JURY

Monsieur le Professeur PINATEL

Permettez-moi de vous exprimer ma sincère et très respectueuse reconnaissance pour la spontanéité avec laquelle vous avez accepté de bien vouloir juger ce travail.

Monsieur le Professeur VALLON

Je vous remercie de l'attention que vous avez bien voulu me témoigner en acceptant de juger ce travail.

Soyez assuré de mon profond respect.

Monsieur le Professeur ODDOUX

Je vous remercie de votre accueil toujours chaleureux.

Je suis heureux de vous compter parmi mes juges et je vous prie de trouver ici le témoignage de ma profonde gratitude.

Madame CHAMBON

Je vous formule toute ma gratitude, non seulement pour vos conseils qui m'ont été très utiles, mais surtout pour le sentiment de confiance que vous avez manifesté à mon égard en me confiant des responsabilités au sein de votre équipe.

AU PERSONNEL DU LABORATOIRE

Merci à Melle D'ARGENTRE dont les travaux préliminaires m'ont éclairé en partie dans la réalisation de ce travail:

J'adresse ma profonde reconnaissance à Mme BARGET:

Sa participation à la réalisation de ce travail m'a apporté un gain considérable en temps.

Je remercie Mme MORIN pour avoir contribué à la traduction de certains de mes textes.

Mes remerciements vont aussi à Melle VUITON pour sa sympathie.

PLAN

Pages

INTRODUCTION.....	1
PREMIERE PARTIE : PROPRIETES DES AFLATOXINES.....	2
I- RAPPELS SUR LES AFLATOXINES NATURELLES.....	3
I-1- HISTORIQUE.....	3
I-2- PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES.....	3
I-3- TOXICITE DES AFLATOXINES.....	5
I-3-1- Toxicité aiguë.....	5
I-3-2- Toxicité chronique.....	5
I-3-2-1- Propriétés cancérigènes de l'aflatoxine B1.....	5
I-3-2-2- Pouvoir tératogène.....	6
I-3-2-3- Effet mutagène.....	6
II- METABOLISME HEPATIQUE DE L'AFLATOXINE B1.....	7
III- ETUDE DE L'AFLATOXINE M1.....	11
III-1- HISTORIQUE.....	11
III-2- EXCRETION DE L'AFLATOXINE M1 DANS LE LAIT.....	11
III-3- STABILITE DE L'AFLATOXINE M1 DANS LE LAIT ET LES PRODUITS LAITIERS.....	16
III-4- TOXICITE DE L'AFLATOXINE M1.....	16
III-5- ASPECTS LEGISLATIFS SUR LA TENEUR EN AFLATOXINE M1 DANS LE LAIT ET LES PRODUITS LAITIERS.....	19
III-5-1- Lois françaises.....	19
III-5-2- Lois américaines.....	19
III-5-3- Lois suisses.....	20

DEUXIEME PARTIE : REFERENCES BIBLIO-	
GRAPHIQUES SUR LA DETECTION ET LE	
DOSAGE DE L' AFLATOXINE M1.....	21
I- INTRODUCTION	22
II- LES METHODES PAR CCM	22
III- LES METHODES PAR HPLC	22
IV- REMARQUE	22
TROISIEME PARTIE : TRAVAUX PERSONNELS...	26
I- CHOIX D'UNE METHODOLOGIE	27
I-1- CARACTERISATION DU PIC D'AFM1	27
I-2- LIMITE DE SENSIBILITE	28
I-3- POURCENTAGE D'EXTRACTION OU RENDEMENT	28
II- LES METHODES DE CCM	28
III- CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE A DETECTION FLUORI-	
METRIQUE	30
III-1- RAPPELS DE LA TECHNIQUE HPLC	30
III-1-1- Principe	30
III-1-2- Schéma général	30
III-1-2-1- Système de pompage	30
III-1-2-2- Système d'injection de l'échantillon	30
III-1-2-3- Colonne et phase stationnaire	31
III-1-2-4- Solvant	32
III-1-2-5- Système de détection	32

III-1-3-	La spectrofluorimétrie.....	33
III-1-3-1-	Rappels sur la fluorescence	33
III-1-3-2-	Aspect pratique du spectrofluorimètre	34
III-2-	DOSAGE DE L'AFMI EN HPLC PHASE INVERSEE AVEC DETECTION FLUORI- METRIQUE : TECHNIQUES D'EXTRACTION ET DE PURIFICATION	37
III-2-1-	Introduction	37
III-2-2-	Essais préliminaires	37
III-2-2-1-	Extraction et purification de l'AFMI sur cartouche C 18 sep Pak.....	37
III-2-2-2-	Modification de la méthode de purification	39
III-2-2-3-	Modification du solvant d'éluion HPLC.....	39
III-2-2-4-	Discussion	40
III-2-3-	Méthodes d'extraction basées sur la précipitation des protéines du lait : expériences personnelles.....	44
III-2-3-1-	Application des techniques d'extraction existantes.....	44
III-2-3-1-1-	Précipitation à l'acétate de plomb.....	44
III-2-3-1-2-	Précipitation au sulfate de cadmium	45
III-2-3-1-3-	Précipitation au méthanol.....	46
III-2-3-1-4-	Vérification de la pureté des extraits obtenus.....	46
III-2-4-	Amélioration de la précipitation des protéines du lait.....	46
III-2-4-1-	Choix d'un nouvel agent précipitant.....	47
III-2-4-1-1-	Le sulfate de zinc.....	47
III-2-4-1-2-	Action combinée du sulfate de zinc et de la soude.....	47
III-2-4-1-3-	Vérification de cette nouvelle technique de précipitation.....	49
III-2-4-1-4-	Choix du volume des échantillons	50
III-2-4-1-5-	Etude du rendement d'extraction.....	50
III-2-4-1-6-	Description détaillée de la présente méthode d'extraction.....	51
III-3-	DOSAGE PROPREMENT DIT DE L'AFMI	54
III-3-1-	Introduction	54
III-3-2-	Appareil utilisé	54
III-3-3-	Solvant d'éluion	58

III-3-4- Résultats obtenus	64
III-3-4-1- Détermination des pics	64
III-3-4-2- Calcul	64
III-3-4-3- Résultats obtenus en utilisant les méthodes d'extraction déjà existantes	72
III-3-4-4- Résultats obtenus avec la présente méthode	72
III-3-4-5- Application de la nouvelle méthode d'extraction à l'analyse de laits et produits laitiers provenant d'un centre laitier lyonnais	74
III-3-4-5-1- Laits liquides	74
III-3-4-5-2- Fromage bleu	75
III-3-4-6- Lait en poudre	75
III-3-5- Influence de la congélation et décongélation sur l'AFM1 ...	84
III-3-5-1- Influence de la décongélation sur le rendement de l'extraction	84
III-3-5-2- Influence de la congélation sur la stabilité	85
III-3-5-2-1- Laits artificiellement contaminés	85
III-3-5-2-2- Laits naturellement contaminés	85
IV DISCUSSION ET CRITIQUE DE LA METHODE	88
CONCLUSION	90
BIBLIOGRAPHIE	92

INTRODUCTION

L'intoxication constatée chez les dindonneaux anglais en 1960 a donné lieu à de très nombreux travaux dans toutes les disciplines sur le problème des aflatoxines (AF). Quatre composés du groupe des aflatoxines ont retenu l'attention des chercheurs : aflatoxines B1, B2, G1 et G2.

L'aflatoxine B1 (AFB1) a été reconnue plus toxique que les autres. Sa présence dans les aliments des bovidés provoque l'apparition d'une toxine dans le lait (milk toxin) et dans les urines ; il s'agit de l'aflatoxine M1 (AFM1) dont la toxicité serait voisine de celle de l'AFB1. Compte-tenu de la place prépondérante qu'occupent le lait et les produits laitiers dans la ration alimentaire, en particulier infantile, des réglementations nationales et internationales ont été élaborées, limitant la teneur en aflatoxines de ces produits. Pour répondre à ces exigences administratives et préserver la santé humaine, plusieurs méthodes de dosage ont été mises au point dont la plus ancienne est la chromatographie sur couche mince (CCM). La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) tend de plus en plus à la supplanter au cours de ces dernières années. Toutes ces méthodes sont longues, onéreuses et peu sensibles. Le but de notre travail est donc d'apporter des améliorations dans le dosage de cette aflatoxine :

Dans un premier temps, nous essayerons de raccourcir l'étape d'extraction et de purification de l'AFM1 grâce à une précipitation importante des protéines du lait.

Dans un deuxième temps, nous tenterons d'améliorer le solvant d'éluion HPLC à partir des résultats obtenus avec le solvant de WINTER-LJN.

En dernier lieu, nous étudierons l'influence de la durée de la conservation sur la stabilité de l'AFM1.

P R E M I E R E

P A R T I E :

P R O P R I E T E S

D E S A F L A T O X I N E S

I-R A P P E L S S U R L E S A F L A T O X I N E S N A T U R E L L E S

Il existe actuellement une multitude de mycotoxines (toxines produites par les champignons microscopiques ou moisissures) dont quatre seulement (Aflatoxines, Ochratoxines, Zéaralénone et Trichothécènes) retiennent l'attention de l'organisation mondiale de la santé pour leurs effets plus ou moins néfastes sur la santé humaine et animale.

Une place toute particulière est accordée aux aflatoxines depuis les intoxications constatées chez les dindonneaux anglais en 1960.

I-1- HISTORIQUE

Isolé des grains d'arachide en 1961 (52), le champignon producteur des toxines a été identifié comme étant l'ASPERGILLUS FLAVUS d'où le nom d'AFLATOXINES (Aspergillus flavus Toxins) (20). Ce terme nous semble impropre car une deuxième souche semble impliquée dans la production des toxines : Aspergillus parasiticus.

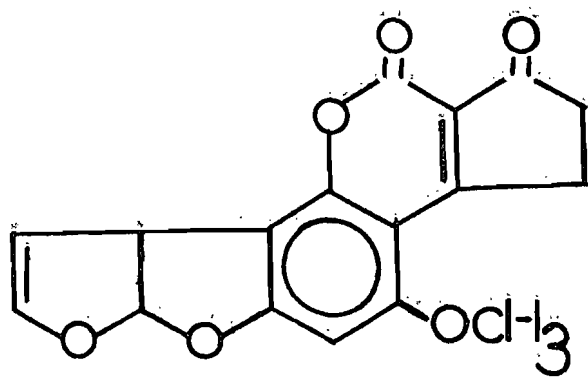
I-2- PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES :

Sur près de 17 composés dénommés Aflatoxines, le terme "Aflatoxines" s'applique habituellement aux quatre composés produits par Aspergillus Flavus et Parasiticus ; ce sont les aflatoxines B1, B2, G1 et G2 : B pour la fluorescence bleue (blue) et G pour la fluorescence verte (green), les indices 1 et 2 étant ceux de la mobilité chromatographique relative. La teneur d'Aflatoxine B1 dans les végétaux naturels est la plus élevée, suivie de celle de l'Aflatoxine G1, les Aflatoxines B2 et G2 étant en quantité infime (44).

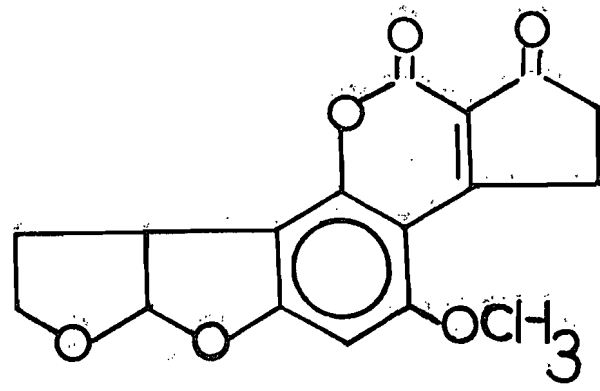
Les structures des Aflatoxines B1 et G1 ont été déterminées par ASAO en 1963 (7) et celle de B2 et G2 par CHANG (19) et HARTLEY (29) Fig 1

FIG1 :

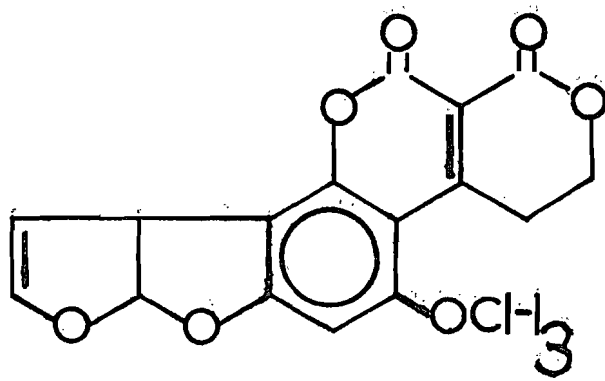
STRUCTURES CHIMIQUES DES
AFLATOXINES NATURELLES



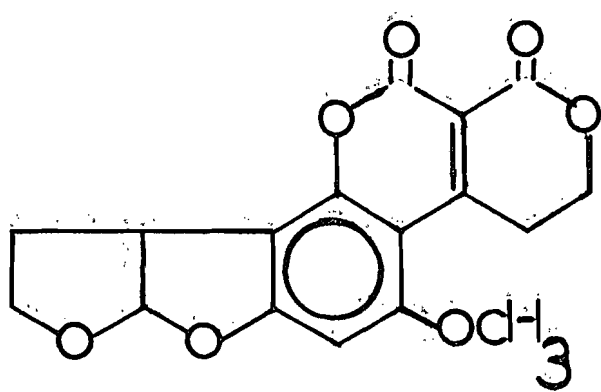
Aflatoxine B₁



Aflatoxine B₂



Aflatoxine G₁



Aflatoxine G₂

I-3- TOXICITE DES AFLATOXINES

I-3-1- Toxicité aiguë :

Les études faites sur des cannetons âgés d'un jour (16) montrent que l'Aflatoxine B1 est deux fois plus toxique que l'Aflatoxine G1, quatre fois plus toxique que l'Aflatoxine B2 et 8 fois plus toxique que l'Aflatoxine G2 comme l'indique le tableau ci-dessous:

(Aflatoxines	:	DL 50 (mg/Kg de poids corporel))

(B1	:	0,36)
(:)
(G1	:	0,78)
(:)
(B2	:	1,70)
(:)
(G2	:	2,45)
(:)
(:)
(:)

Tableau comparatif de la toxicité aiguë des Aflatoxines chez des cannetons âgés d'un jour (20)

L'organe cible étant le foie (hépatite, cirrhose) on a pu noter des cas de syndrome de Rye (encéphalopathie, dégénérescence grasseuse) et de néphrotoxicité(8)

I-3-2- TOXICITE CHRONIQUE

La toxicité chronique de l'Aflatoxine B1 s'est révélée plus importante que celle des autres composés. Elle est cancérogène, tératogène et mutagène.

I-3-2-1- Propriétés cancérogènes de l'aflatoxine B1

Les études de CARNAGHAN (17) et LANCASTER (36) ont montré que ce pouvoir cancérogène se manifeste par l'apparition de tumeurs au niveau hépatique. Il semble que tous les animaux d'expérimentation soient sen-

sibles à cet effet. Une relation dose-réponse linéaire a été démontrée par WOGAN (60).

Taux d'AFB1 (µg/Kg ali- ment)	Durée du traitement (semaines)	Incidence cancéreuse au niveau du foie ^b	Temps d'apparition de la première tumeur (semaines)
0	74-109	0/18 ^c	—
1	78-105	2/22	104
5	65-93	1/22	93
15	69-96	4/21 ^d	96
50	71-97	20/25 ^e	82
100	54-88	28/28 ^e	54

Tableau caractéristique de la dose-réponse de la cancéro-généicité de l'AFB1 chez le rat Fischer mâle^a (44)

a : In : WOGAN et al (1974)

b : chez les animaux exposés (survie > 50 semaines)

c : Rat dont la survie fut maximale

d : Métastases pulmonaires chez 2 rats

e : " " " 4 rats.

On remarque dans cette étude que le pouvoir cancérigène se manifeste aussi au niveau pulmonaire.

I-3-2-2- Pouvoir tératogène :

Une étude réalisée sur l'embryon de poulet (23) a montré que l'Aflatoxine B1 possède des propriétés tératogènes. Ces mêmes effets n'ont pas été observés chez la souris.

I-3-2-3- Effet mutagène :

Il se manifeste par des aberrations chromosomiques et une rupture de l'A D N dans les cellules végétales et animales (45) de même que par des mutations génétiques (61).

II- METABOLISME HEPATIQUE DE L' AFLATOXINE

B 1

Plusieurs études effectuées in vivo et in vitro montrent que l'aflatoxine B1 donne naissance à des métabolites hydroxylés (figure 2) généralement dépourvus de toxicité sauf l'aflatoxine M1 (14) . Ces métabolites se retrouvent dans les fécès, les urines et le lait.

Plusieurs enzymes seraient impliquées dans ce processus de métabolisme (44) :

- les enzymes microsomiales retenues par la plupart des auteurs, catalysent les principales réactions métaboliques.
- la deshydrogénase cytoplasmique NADH-dépendante intervient dans la conversion de l'aflatoxine B1 en aflatoxicol et en aflatoxicol H1 en passant par l'aflatoxine Q1 .

Au cours de cette biotransformation, il se produit une activation métabolique conduisant à la formation d'un composé époxyde supposé être responsable des effets toxiques des aflatoxines, ce qui expliquerait les phénomènes de susceptibilité individuelle affirmés dans le tableau 1 .

Les propriétés physico-chimiques de l'aflatoxine B1 sont représentées dans le tableau 2.

FIG 2 :

METABOLISME HEPATIQUE
DE L'AFLATOXINE B₁ (42, 44)

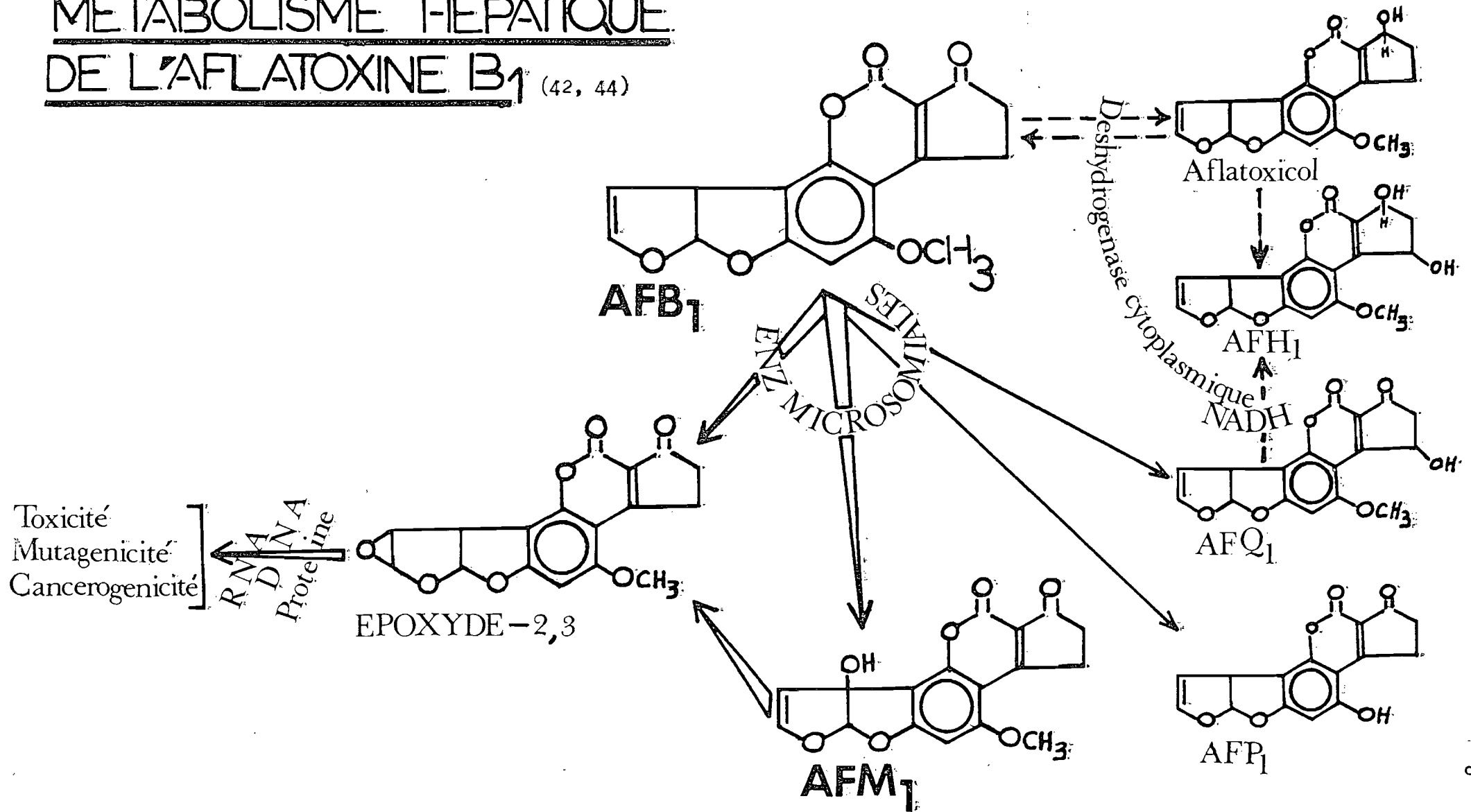


TABLEAU 1 :

Espèce	DL 50 (mg/kg poids corporel)	Zone de la lésion hépatique
Poulet (embryon)	0,025	—
Lapin	0,3	Médiane moyenne
Caneton	0,335	Périportale
Chat	0,55	Périportale
Porc	0,62	Centrilobulaire
Chien	0,5 - 1,0	Centrilobulaire
Mouton	1,0	Centrilobulaire
Cobaye	1,4	Centrilobulaire
Babouin	2,0	Centrilobulaire
Rat mâle	7,2	Périportale
Macaque femelle	7,8	Centrilobulaire
Souris	9,0	—
Hamster	10,2	—
Ratte	17,9	Périportale

TOXICITE AIGUE DE L'AFB₁ (44)

TABLEAU 2 :

PROPRIETES PHYSIQUES ET CHIMIQUES DE L'AFB₁ ET SES METABOLITES

Aflatoxines	Formule moléculaire	Masse moléculaire relative	Point de fusion °C	Absorption dans l'UV (ε) ^c		Emission fluorescente (nm)
				265 nm	360-362 nm	
B 1 ^a	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312	268-269	12400	21800	425
M 1	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	299	14150	21250 (357 nm)	425
P 1 ^b	C ₁₆ H ₁₀ O ₆	298	>320	11200 (267 nm)	15400 (362 nm)	-- f
Q 1	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	- e	11450 (267 nm)	17500 (366 nm)	-- f
Aflatoxicol	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	230-234 ^d	10800 (261 nm)	14100 (325 nm)	425

a : coefficient d'absorption molaire de l'Aflatoxine B1 d'après RODRICKS et al (1970) et de M1 d'après STUBLEFIELD et al (1972).

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 en solvants se trouvent dans les publications originales.

d : d'après BUTLER. 1964

e : non disponible.

f : la fluorescence violette de la M1 et la fluorescence jaune-vert des P 1 et Q 1 sont indiquées dans les publications originales.

III - É T U D É D E L ' A F L A T O X I N E M 1

III-1 HISTORIQUE :

ALLCROFT et Al (1) constatent qu'un lait provenant de vaches nourries avec des aliments contaminés en aflatoxines provoque des lésions hépatiques chez des cannetons. La toxine responsable a été identifiée comme étant l'Aflatoxine M "Milktoxin" caractérisée par une fluorescence violette (22).

L'Aflatoxine M1 est donc un métabolite hydroxylé de l'Aflatoxine B1 (12, 31, 39). En plus de son élimination dans le lait, elle se retrouve aussi dans les urines et les fèces des animaux ayant consommés des aliments contaminés (39, 43) ainsi que dans les urines humaines (13).

III-2- EXCRETION DE L'AFLATOXINE M1 DANS LE LAIT :

L'Aflatoxine M1 s'élimine dans le lait des bovidés lorsque ceux-ci sont soumis à un régime alimentaire contenant de l'Aflatoxine B1. Si tous les auteurs sont unanimes sur ce point, il subsiste néanmoins des écarts d'appréciation sur la teneur de ce métabolite, tableau 3 ;

Il existe une relation linéaire entre la quantité d'aflatoxine B1 ingérée quotidiennement et le taux d'aflatoxine M1 secrétée dans le lait (2, 51), fig. 3.

L'élimination d'aflatoxine M1 dans le lait atteindrait son maximum 48 h après la première prise alimentaire, puis diminuerait progressivement pendant les trois premiers jours qui suivent le retour à une alimentation normale (3; 34) (figure 4). Chez la brebis (43) ; après l'administration unique d'une dose d'aflatoxines ; la diminution de l'élimination est effectivement progressive ; mais il apparaît une légère augmentation du taux avant sa négativation complète (figure 5) ; cela s'expliquerait par une libération éventuelle de l'aflatoxine de son site de fixation.

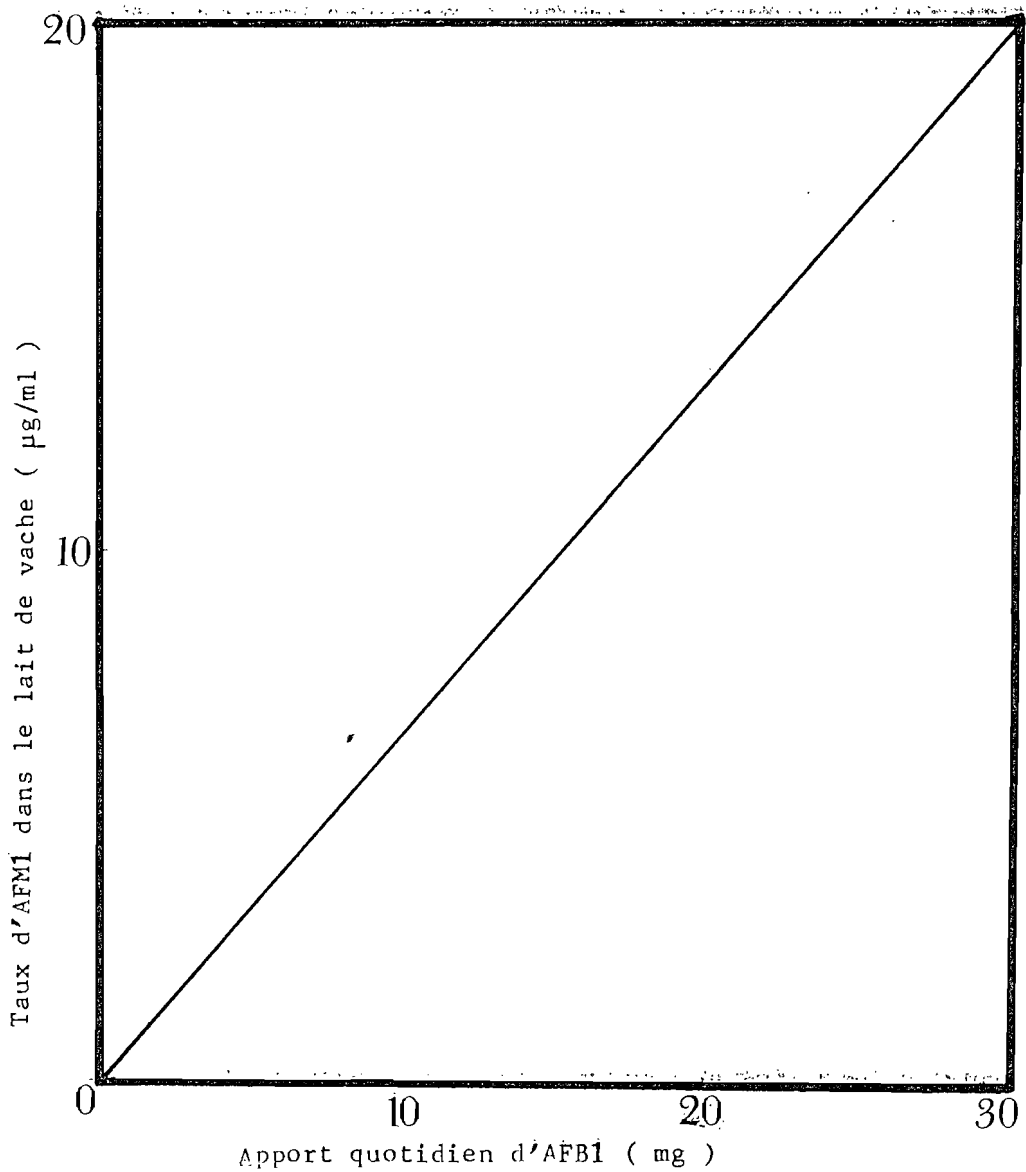
Remarque : l'aflatoxine B1 s'élimine aussi dans le lait mais en quantité infime (3; 43) .

TABLEAU 3 :

Auteurs	Pourcentage d'aflatoxine M1 excrétée
(3) ALLCROFT 1968	0,35
(40) MASRI 1969	0,5 - 3,9
(47) POLAN 1974	0 - 0,3
(33) LAFONT 1975	0,78 - 0,90
(34) LAFONT 1980	0,14 - 0,95
(46) PATTERSON 1980	1 - 3,3
* NEUMAN-KLEINPAUL 1972	1,39
* HOWERSLAND 1973	0,43
* KIERMEIER 1973	0,86
* KIERMEIER et MUCKE	0,18
* ENGEL et HAGEMEISTER	< 0,6

* : Extrait de Thèse FREMY (24) :

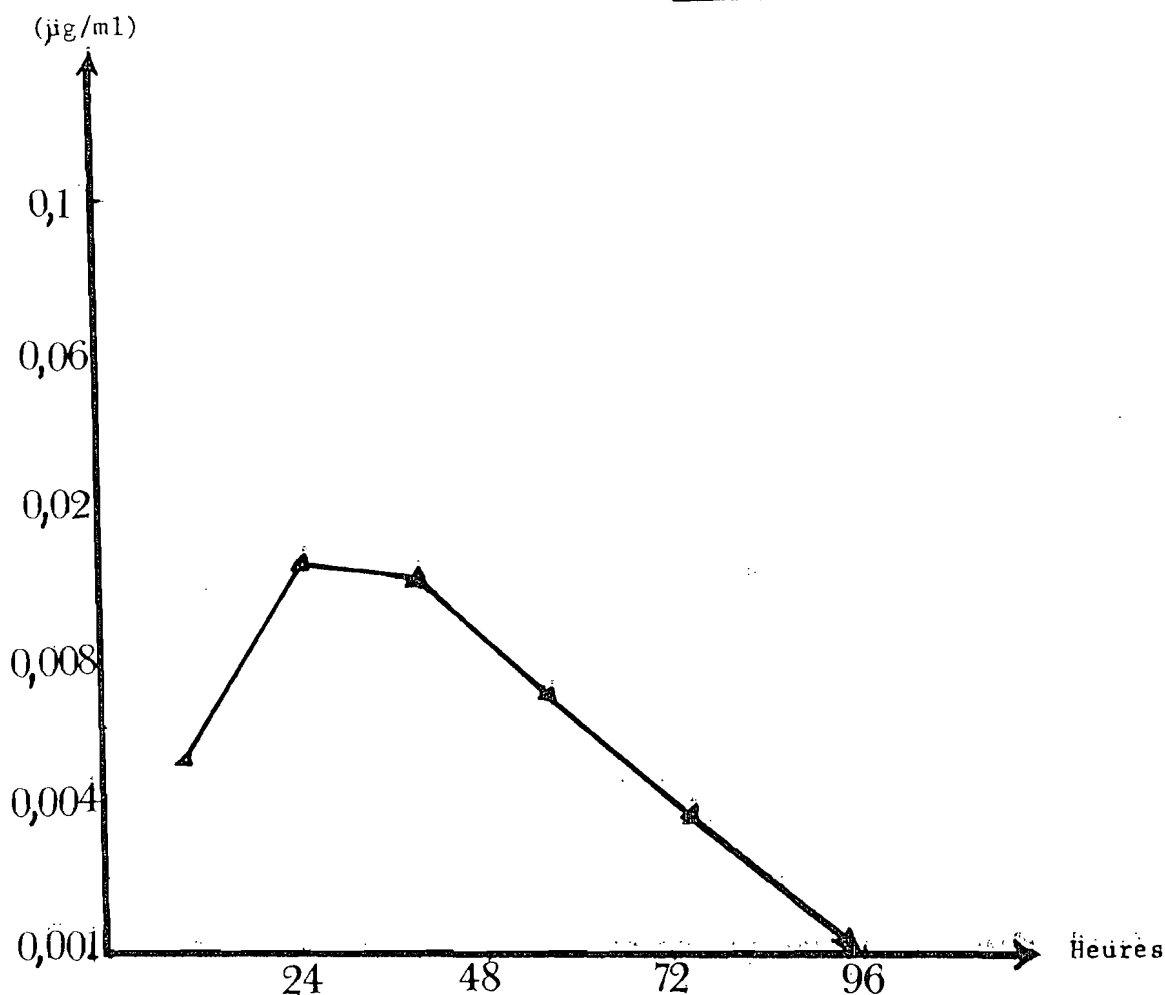
EXCRETION D'AFM₁ EN POURCENTAGE
D'AFIB₁ INGEREE

FIG 3 :

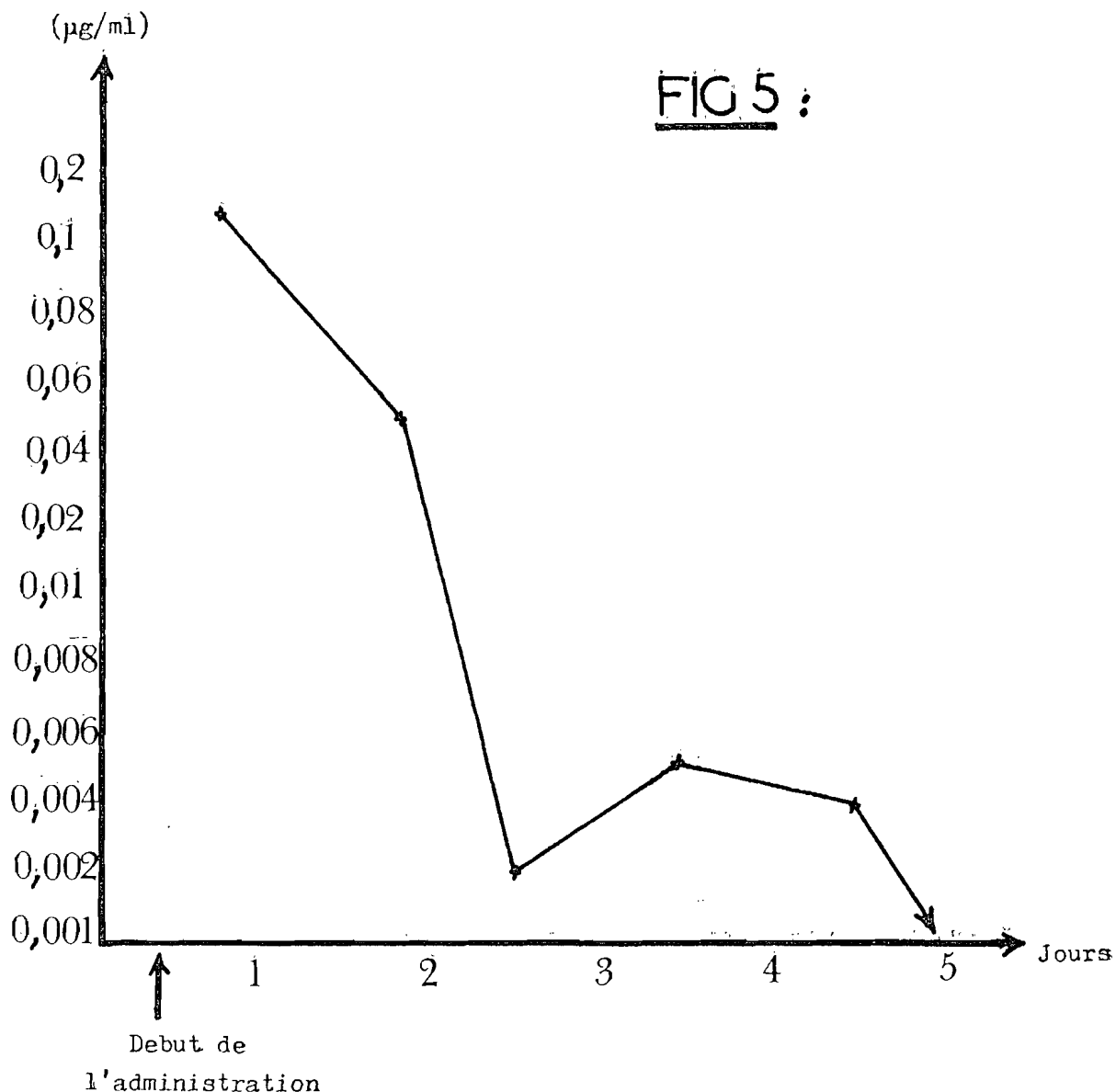
RELATION ENTRE L'APPORT QUOTIDIEN
D'AFB₁ ET LE TAUX RESULTANT D'AFM₁
DANS LE LAIT DE VACHE D'APRES LES
DONNEES EXPERIMENTALES PUBLIEES (44)

AFM₁ dans le lait

FIG 4 :



EXCRETION DE L'AFM₁ DANS LE LAIT DE
VACHE APRES ADMINISTRATION ORALE
D'UNE DOSE UNIQUE (300 NG) D'AFFLATO-
XINES (B₁ 44%, G₁ 44%, B₂ 22%)

AFM₁ dans le lait

EXCRETION DE L'AFM₁ DANS LE LAIT DE
BREIBIS APRES ADMINISTRATION ORALE
D'UNE DOSE UNIQUE D'AFLATOXINES (1MG/KG
36% B₁ 52% C₁ 3% B₂ 2% C₂

III-3 STABILITE DE L'AFIATOXINE M1 DANS LE LAIT ET LES PRODUITS LAITIERS:

Les effets de la variation thermique sur le comportement de l'Aflatoxine M1 sont résumés dans le tableau ci-dessous:

Auteurs	Type de traitement	% de perte
PURCHASE 1972 (51)	Pasteurisation 62 C pendant 30 mn	33
	72 C pendant 45 sec	45
STOLOFF 1975 (53)	Pasteurisation 63 C pendant 30 mn	pas de perte
	77 C pendant 16 sec	
	Congélation (-18 C) après 120 j	45 % après un début de diminution à partir du 68 e jour
MC KINNEY 1973 (41)	Congélation (-18 C) après 120 j	87 % avec un début de diminution à partir du 68 e jour
	Conservation à 0 C pendant 4-6 j	10 %
KIERMEIER 1977 (32)	Conservation à 5 C pendant 1-3 j	11 - 25 %
POLZHOFFER 1977 (48)	90 C pendant 3 - 30 mn	9 %

III-4 - TOXICITE DE L'AFIATOXINE M1

L'Aflatoxine M1 est le seul métabolite hydroxylé de l'Aflatoxine B1 reconnue toxique. Sa toxicité aiguë serait proche de celle de l'Aflatoxine B1(50,60) mais avec un faible pouvoir cancérigène (60) (tableau 4) et mutagène (61).

Les organes cibles sont les mêmes que ceux de l'Aflatoxine B1. Chez les truites, l'Aflatoxine M1 provoquerait une dégénérescence céroïde au niveau du foie, des nodules hyperplasiques et des hépatomes (15).

TABLEAU 4 :

	doses utilisées	espèce animale utilisée	observations
toxicité aigüe d'après PURCHASE (50)	AFB ₁	12 µg/ani- mal	canetons de Pékin agés d'un jour
	AFM ₁	16 µg/ani- mal	lésions semblables
toxicité chronique selon WOGAN (60)	AFB ₁	25 µg/j pendant	tumeurs chez 9 rats sur 9 après 53 sem- aines
	AFM ₁	5 jours	tumeurs chez un rat sur 29 après 100 semaines

TABLEAU COMPARATIF DE LA TOXICITE DES
AFB₁ ET M₁

Comme pour l'aflatoxine B1, il semble exister une certaine relation dose-réponse concernant l'effet cancérigène chez la truite mâle, la truite femelle donnant une réponse aberrante. Mais, dans les deux cas, L'aflatoxine M1 se montre moins cancérigène que l'aflatoxine B1 (44) c.f. tableau ci-dessous :

concentration d'aflatoxine (µg/kg aliment	incidence tumorale au niveau du foie chez les :	
	mâles	femelles
M1 : 4	4/28 (14 %)	13/27 (48 %)
M1 : 16	22/27 (81 %)	11/14 (79 %)
M1 : 32	24/25 (96 %)	13/14 (93 %)
M1 : 64	21/24 (88 %)	9/10 (90 %)
B1 : 4	15/22 (68 %)	18/23 (78 %)

Hépatocancérogénicité de l'aflatoxine M1 pour la truite arc-en-ciel

III-5- ASPECTS LEGISLATIFS SUR LA TENEUR EN AFLATOXINE M1 DANS LE LAIT ET LES PRODUITS LAITIERS

Le lait et les produits laitiers occupent une place prépondérante dans la ration alimentaire humaine et en particulier infantile ; c'est pourquoi des réglementations nationales et internationales ont été élaborées, permettant ainsi de préserver la santé humaine mais aussi d'assainir les échanges commerciaux.

III-5-1- Lois françaises :

III-5-1-1- Arrêté du 1er juillet 1976, J.O. du 13 et 14 septembre 1976 (11):

Teneur maximale d'aflatoxines (type non précisé) dans les aliments diététiques et de régime de l'enfance = 5 µg/kg (5ppb).

III-5-1-2- Arrêté du 16 janvier 1980, J.O. du 16 février 1980 (18):

Aflatoxines dans les préparations de lactosérum hydrolysées par voie enzymatique ; taux maximal = 5 µg/kg (5ppb).

III-5-1-3- Communication de la direction de la consommation et de la répression des fraudes. Service régional Rhône-Alpes :

Un arrêté en cours de préparation fixera la teneur en aflatoxine M1 à 10 ng/100Kcal jusqu'au 31 décembre 1982; puis ce taux sera abaissé à la demande des assemblées d'hygiène et de médecine à 4 ng/100 Kcal à partir du 1er janvier 1983.

Valeurs énergétiques de quelques laits du commerce (6):

- Régilait : 1500 KJ/100 g (1 KJ = 4,18 cal.)
- Quick lait : 2090 KJ/100 g
- Lait demi-écrémé en poudre : 1840 KJ/100 g

III-5-2- Lois américaines :

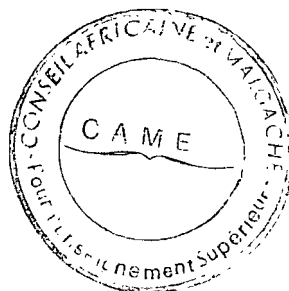
La FDA limite le taux d'AFM1 à 0,5 µg/l (0,5 ppb) dans le lait liquide(54).

III-5-3- Lois suisses :

Elles sont beaucoup plus rigoureuses et précises.

- Loi du 19 septembre 1978 (58) :

- taux limites : - 250 ng/kg (250 ppt) pour le fromage
- 50 ng/l (50 ppt) pour le lait
- 10 ng/kg (10 ppt) pour les aliments
lactés pour enfants.



D E U X I E M E

P A R T I E :

REFERENCES BIBLIO-
GRAPHIQUES SUR LA
DETECTION ET LE DOSA-
GE DE L'AF LATOXINE M₁

I- I N T R O D U C T I O N

La chromatographie sur couche mince (CCM) est la plus ancienne des méthodes de dosage de l'AFM1 en l'occurrence celle de PONS qui continue de faire l'objet de multiples améliorations. Au cours de ces dernières années, les méthodes de chromatographie liquide à haute performance (HPLC) tendent de plus en plus à les supplanter à cause de leur rapidité, de leur sensibilité et de leur spécificité. Toutes ces méthodes ont en commun des problèmes d'extraction et de purification qui font d'elles des méthodes longues et très coûteuses, voire peu sensibles.

II- L E S M E T H O D E S P A R C C M : Tableau 5 et 6

Toutes ces méthodes nécessitent un grand volume d'échantillon, ce qui les rend inutilisables pour des microdosages. Leur limite de détection est élevée. Seule, la méthode de LAFONT semble relativement sensible mais très difficilement réalisable.

III- L E S M E T H O D E S P A R H P L C : Tableau 7

Si la plupart d'entre elles ont réduit la longueur des opérations, elles n'ont pu remédier à l'insuffisance de la sensibilité. En plus, elles sont toutes confrontées au problème de la mauvaise résolution des pics d'AFM1.

IV- R E M A R Q U E

Il existe des méthodes beaucoup plus rapides dont la méthode de HOLADAY (30) utilisant une mini-colonne réactive. Malheureusement, elle reste une simple méthode rapide de screening à cause de sa limite de détection élevée : 0,2 µg/kg (0,2 ppb).

TABLEAU 5 : METHODES CCM EXISTANTES

Auteurs	Agents précipitant des protéines	Solvant d'extraction	Purification	Type de CCM	Limite de détection	Observations
PONS 1973 (49)	Acétate de plomb + hyflo-super cel ou célite 545	Acétone	- Hexane + solution salée (NaCl) - colonne de cellulose	1 dimension	0,1 - 0,2 µg/l	- Nécessite une double filtration - limite de détection élevée
STUBBLEFIELD 1974 (Méthode de PONS modifiée) (55)	Acétate de Plomb + hyflo-super cel ou célite 545 + solution saturée de sulfate de sodium	Acétone	NaCl remplacé par HCl	1 dimension	0,1 µg/l (lait liquide) 0,2 µg/Kg (fromage) 1 µg/Kg (lait poudre).	- nécessite une double filtration - limite de détection élevée.
TUINSTRAL 1975 (59)	Sulfate de cadmium	Chloroforme	Colonne de silice	2. dimensions	visuelle : 0,02 µg/Kg Densitométrie : 4 ng/Kg	- nécessite un grand volume d'échantillon (60 ml) et un dépôt de 50 µl.
Méthode AOAC 1975 (4)	M E T H O D E D E S T U B B L E F I E L D (1 9 7 4)					
GAUCH 1979 (27)	NaCl (solution saturée)	Chloroforme	colonne de silice	2 dimensions	densitométrie : 50 ppt	- grand volume d'échantillon et solvant délicat

TABLEAU 6 : METHODES CCM SUITE

Auteurs	Agents précipitant des protéines	Solvant d'extraction	Purification	Type de CCM	Limite de détection	Observation
STUBBLEFIELD, 1979 (56)	NaCl (solution saturée)	Chloroforme	colonne silice	1 dimension	0,1 µg/kg (0,1 ppb)	- formation de grumeaux surtout avec le lait en poudre.
Méthode AOAC 1980 (5)	M E T H O D E D E S T U B B L E F I E L D (1 9 7 4)					
FUKAYAMA, 1980 (26)	Absorption sur colonne de matrice hydrophilique.	Mélange chloroforme-acétone (9-1)	colonne de silice	1 dimension	0,3 ppb	- utilisation de deux colonnes donc coûteux. - grand volume d'échantillon. - limite de détection élevée.
LAFONT, 1981 (35)	Isopropanol + célite + méthanol	Chloroforme	colonne d'alumine + silice	1 dimension	10 ng/Kg (10 ppt)	- grand volume d'échantillon - beaucoup de solvants - laborieux.

TABLEAU 7 : METHODES HPLC EXISTANTES

Auteurs	Agent précipitant des protéines	solvant d'extraction	Purification	Phase et solvant utilisés	Limite de détection	Observations
WINTERLIN 1979 (62)	Passage direct sur colonne C 18 sep Pak puis extraction par Acétonitrile - eau (30 - 70)			- phase inversée (µC 18 Bondapak) - Acétonitrile - eau (28 - 72).	0,1 ppb	Méthode rapide mais limite de détection élevée. Mauvaise séparation du pic M1.
BEEBE 1980 (9)	Méthode AOAC. 1975.			- sphérisorb -ODS - mélange acéto-nitrile-méthanol (3-2) 20 % dans l'eau	0,3 ppb	- double filtration. - débit trop élevé (3, 2 ml/mn) - temps de rétention élevé (20 mn) - limite de détection élevée
BLANC 1980 (10)	Solvant ternaire (eau-méthanol-chloroforme)	chloroforme	colonne de silice	- silice - Dichlorométhane-Méthanol-eau (96-3,6-0,4)	0,15 ppb	- limite de détection non améliorée malgré l'utilisation d'une cuve remplie de silice (augmente la sensibilité).
FREMY 1981 (25)	Hyflo-supercel	chloroforme	cartouche de silice sep pak	- phase inversée: lichrosorb RP 18 - Acétonitrile-eau(28-72)	0,1 ppb	- Pas d'amélioration de la sensibilité - forte odeur de CHCl ₃ - Mauvaise résolution du pic M1
GREGORY 1981 (28)	Acétate de plomb + hyflosupercel ou célite 545 + sulfate d'ammonium	Acétone	colonne de silice	- phase inversée RP 18 muni d'une précolonne de silice - eau-acétonitrile-méthanol (66-25,2-8,8)	0,1 ppb	- Pas d'amélioration de la sensibilité - Mauvaise résolution

T R O I S I E M E
P A R T I E :
T R A V A U X P E R S O N N E L S
D O S A G E D E L A F L A T O X I N E M
D A N S L E L A I T E T L E S P R O -
D U I T S L A I T I E R S

I - CHOIX D'UNE METHODOLOGIE

Lors de la mise au point d'une méthode d'analyse, on est souvent confronté à plusieurs possibilités :

- soit procéder à une détection visuelle, rapide et peu onéreuse (Exemple CCM),
- soit utiliser des techniques de dosage précises, très sensibles mais longues et coûteuses.

Dans le cas de l'Aflatoxine M1 dans le lait, ces deux types de méthodes ne semblent pas se différencier au niveau de la sensibilité ni celui de la durée des opérations. Des deux côtés, il se pose le problème fondamental de l'extraction et de la purification de l'Aflatoxine M1.

Notre expérimentation portera beaucoup plus sur les méthodes HPLC que sur les CCM. Ce choix comportera trois étapes essentielles :

- caractérisation du pic d'AFM1 en HPLC,
- détermination de la limite de détection,
- détermination du rendement d'extraction.

I-I- CARACTERISATION DU PIC D'AFM1 :

Les conditions d'analyses étant remplies, il suffit de déterminer d'abord les pics dus au solvant pur puis ceux du même solvant contenant l'AFM1. La confirmation se fait par comparaison des temps de rétention des pics ou mieux encore par l'utilisation de dilution croissante de la solution d'AFM1, la surface des pics d'AFM1 diminuant en même temps que sa teneur dans le solvant. On peut aussi réaliser un ajout : une quantité connue d'AFM1 est ajoutée à une solution d'AFM1 de concentration déterminée. On obtient alors un pic unique dont la surface est augmentée (l'augmentation tient compte des phénomènes de dilution).

I-2- LIMITE DE SENSIBILITE (Limite de détection)

Elle détermine la concentration la plus faible d'AFM1 détectable en HPLC. Il suffit pour cela d'injecter des dilutions croissantes de solution d'AFM1. Cette limite de détection doit être égale à 5 fois le bruit de fond.

I-3- POURCENTAGE D'EXTRACTION OU RENDEMENT

Il permet d'évaluer les pertes au cours de l'opération afin de définir un facteur de correction pour le résultat final. Le rendement d'une méthode doit être le plus reproductible et le plus élevé possible. Pour le déterminer, il suffit de procéder à des ajouts dosés.

II - LES METHODES PAR CCM

Plusieurs études ont déjà été consacrées à l'étude comparative des différentes méthodes de CCM et il en résulte d'après FUKAYAMA (26) qu'il n'y a pas de différence fondamentale au niveau du rendement mais au niveau du temps de manipulation (tableau ci-dessous). FREMY (24) de son côté souligne que la technique de CCM est plus ou moins fidèle à la limite de détection de 0,1 ppb.

Etude comparative effectuée par FUKAYAMA sur un échantillon de 0,1 ppb :

Méthodes	Rendement en %	Durée de l'analyse/échantillon (heure)
AOAC 1975 (Méthode officielle)	81,8 ± 7,7	4 h 30 - 5 h
TUINSTRAL 1975	85,6 ± 12,1	3 h - 3 h 30
STUBBLEFIELD 1979	86,3 ± 8	2 h
FUKAYAMA 1981	80,5 ± 5,9	2 h

III - CHROMATOGRAPHIE LIQUÏDE A HAUTE PERFORMANCE AVEC DETECTION FLUORIMETRIQUE :

III-1- RAPPEL DE LA TECHNIQUE HPLC :

L'HPLC est une variable des méthodes de chromatographie (Séparation des éléments d'un mélange en solution par migration sur un support). Elle se caractérise par son éluant envoyé sous pression dans la colonne, cette dernière étant remplie d'une phase stationnaire de fine granulométrie. La phase stationnaire peut être modifiée ou non suivant le type de rétention qu'elle fournit.

III-1-1- PRINCIPE :

Une faible quantité de l'échantillon est injectée au sommet d'une colonne. La séparation des différents constituants de l'échantillon s'effectue dans la colonne grâce à l'envoi sous pression d'un solvant d'éluion. La détection se réalise grâce à la transformation de l'émission d'une fluorescence en un signal électrique capté au niveau d'un enregistreur

III-1-2- Schéma général : figure 6

III-1-2-1- Système de pompage :

Il permet l'envoi de la phase mobile dans la phase stationnaire (colonne). Le débit du solvant doit être précis et constant dans le temps car il conditionne le temps de rétention des pics.

Pour notre étude, nous avons utilisé le modèle Kontron : LC Pump 410 dont la pression varie entre 0 et 400 bars avec un débit allant de 0,1 à 9,9 ml/mn.

III-1-2-2- Système d'injection de l'échantillon :

Elle conditionne la reproductibilité et la fiabilité de la méthode. Plusieurs systèmes d'injection étant possibles, nous avons opté pour une vanne à boucle type Rhéodyne d'un volume de 20 µl. La vanne est

munie d'un levier sur lequel on applique un mouvement de va et vient permettant d'injecter l'échantillon dans le solvant.

III-1-2-3- Colonne et phase stationnaire

Sous le nom de colonne, on désigne habituellement le contenant (acier inoxydable) et le contenu (phase stationnaire).

Selon la nature de la phase, les constituants d'un même échantillon peuvent se séparer différemment.

Nature de la phase stationnaire :

Elle permet de distinguer deux types d'HPLC :

- HPLC en phase normale :

La phase stationnaire est polaire; le solvant apolaire et le soluté polaire.

- HPLC en phase inverse :

Il s'agit d'une modification de la phase normale par greffage d'une chaîne hydrocarbonnée pour la rendre apolaire. C'est l'inverse de la précédente.

Dans le cadre de notre étude, nous avons utilisé une colonne aux caractéristiques suivantes :

. colonne :

longueur = 15 cm

diamètre intérieur = 4,5 mm environ

fritté métallique de 1 - 2 μm

. Phase stationnaire :

Lichrosorb RP 18 (phase inverse) Type Merck

Granulométrie : 5 μm

Fonction greffée : chaîne hydrocarbonnée en C 18

III-1-2-4- Solvant :

Son choix est fonction de la polarité de la phase stationnaire et de l'échantillon. Il doit être pur et non corrosif pour la phase stationnaire. En cas de mélange, il est important de respecter rigoureusement les proportions des différents réactifs afin d'éviter la modification de la polarité dont la variation se répercute sur le temps de rétention.

Le débit du solvant doit toujours être constant dans le temps. Un dégazage parfait du solvant est nécessaire pour éviter des bulles d'air dans la colonne.

Pour notre étude, nous avons utilisé un mélange Acétonitrile méthanol-eau (20 - 5 - 75) avec un débit de 1 ml/mn - les raisons de ce choix seront expliquées ultérieurement.

III-1-2-5- Système de détection :

Tout système de détection doit perturber au minimum la séparation effectuée sur la colonne. La cellule utilisée doit donc être de très faible volume (environ 10 μ l).

Caractéristiques d'un détecteur :

- sensibilité ou seuil de détection :

On peut la définir comme étant un signal égale à 5 fois le bruit de fond.

- la spécificité.

- bruit de fond :

Il dépend de la stabilité de la partie électronique du détecteur et des variations du débit et de la température de la phase mobile.

- la linéarité :

La réponse du détecteur varie linéairement avec la concentration dans des limites à ne pas dépasser.

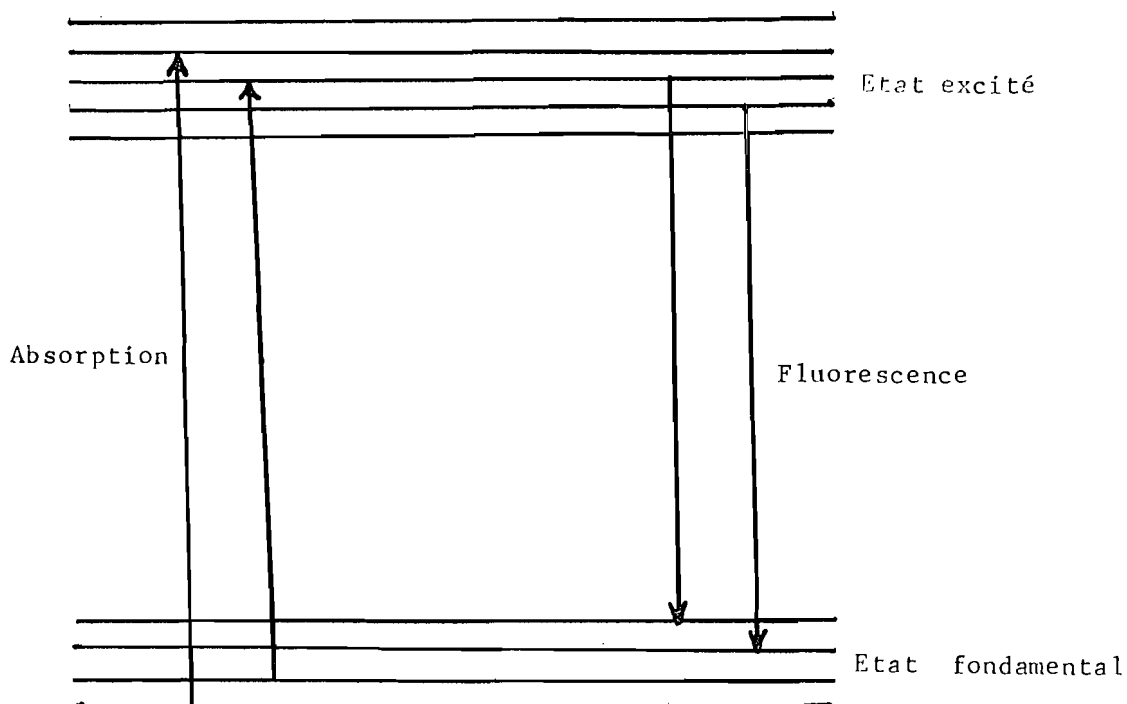
Nous avons utilisé pour notre étude un détecteur spectrofluorimétrique Kontron.

III-1-3- La spectrofluorimétrie

III-1-3-1- Rappels sur la fluorescence :

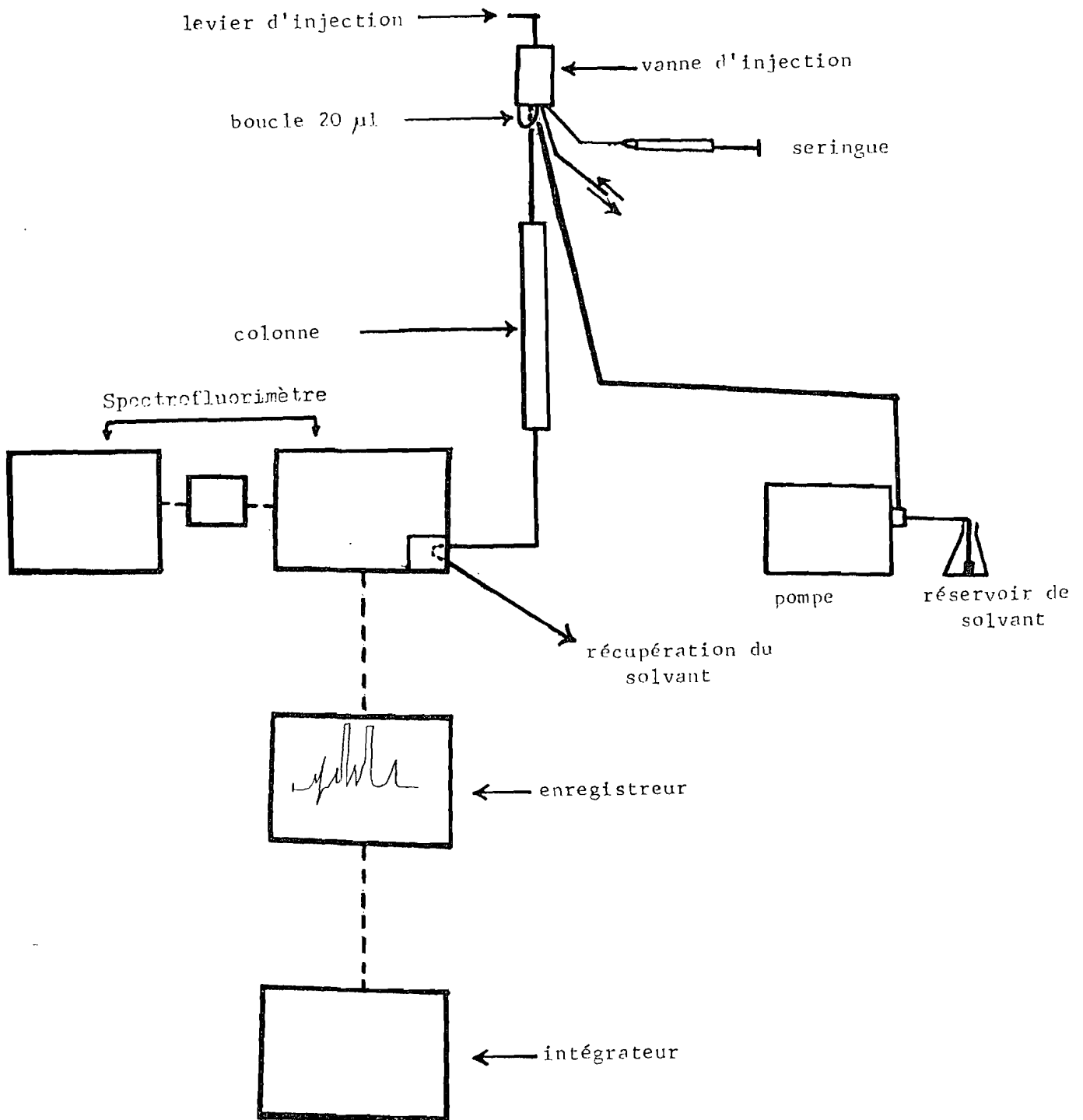
La fluorescence est en général une émission de radiations par un composé sous l'influence d'une radiation excitatrice déterminée.

Sous l'effet de la radiation excitatrice, l'électron (électron optique) d'une orbite d'un certain niveau énergétique (état fondamental) passe à une orbite d'un niveau supérieur (état excité). C'est le retour de cet électron à son niveau énergétique de départ qui provoque la fluorescence.



III-1-3-2- Aspect pratique du spectrofluorimètre (Kontron)

La traversée de la solution à doser par une lumière monochromatique entraîne une fluorescence qui se traduit par un signal électrique capté sur un enregistreur. Le rayonnement fluorescent est émis dans toutes les directions. Une fraction déterminée de ce rayonnement est recueillie selon un axe faisant un angle droit avec la lumière excitatrice, la source de cette dernière étant une lampe au Xénon à spectre continu (200 à 800 nm) Fig.7

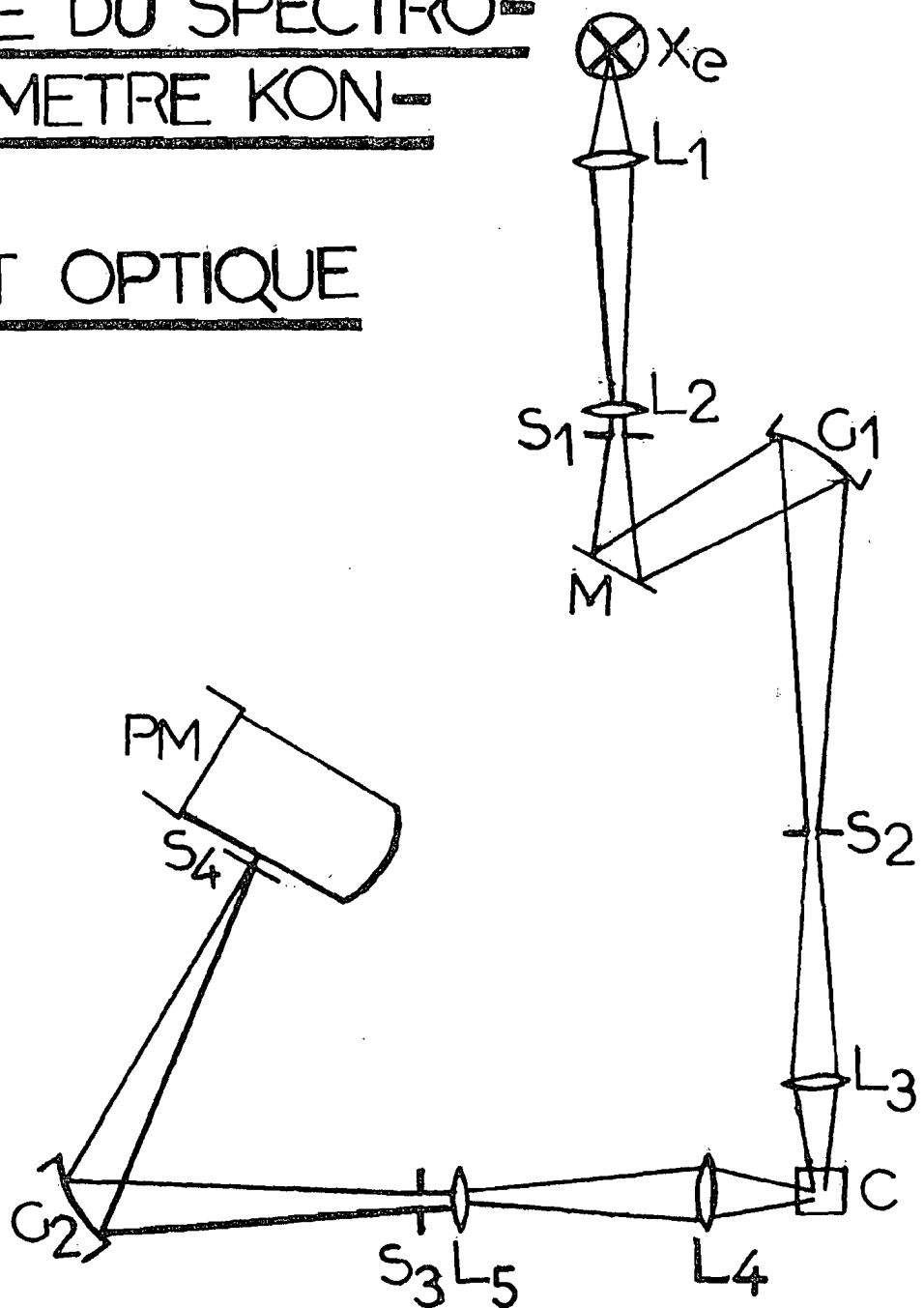
FIG.6 :

SCHEMA GENERAL DE L'HPLC A
DETECTION FLUORIMETRIQUE

KONTRON

FIG 7 :

PRINCIPE DU SPECTRO-
FLUORIMETRE KON-
TRON
TRAJET OPTIQUE



- | | |
|--|------------------------|
| Xe | Lampe au xenon |
| L ₁ .L ₂ .L ₃ .L ₄ .L ₅ | Lentilles convergentes |
| S ₁ .S ₂ .S ₃ .S ₄ | Fentes |
| M | Miroir |
| G ₁ .G ₂ | Monochromateurs |
| C | Cellule |
| PM | Photomultiplicateurs |

III-2- DOSAGE DE L'AFM1 en HPLC PHASE INVERSEE A DETECTION FLUORIMETRIQUE :
TECHNIQUES D'EXTRACTION ET DE PURIFICATION :

III-2-1- Introduction

Nous avons remarqué au cours de notre bref rappel, qu'aucune des méthodes préconisées simples et rapides n'est parvenue à résoudre le problème de la sensibilité et surtout de la résolution du pic AFM1. Au cours de ce travail, nous tâcherons d'atteindre quatre objectifs essentiels qui ont plus ou moins fait défaut aux méthodes de chromatographie liquide haute performance déjà existantes :

- Diminuer le temps d'analyse en éliminant la purification sur colonne chromatographique.
- Réduire le coût de l'analyse grâce à la diminution de la quantité de solvants.
- Améliorer la sensibilité.
- Améliorer la résolution du pic d'AFM1.

III-2-2- Essais préliminaires

Des travaux antérieurs réalisés au laboratoire par B. D'ARGENTRE (21) avaient permis d'étudier les cartouches de purification en prenant comme base la méthode de WINTERLIN(62) utilisant une cartouche C₁₈ sep pak.

III-2-2-1- Extraction et purification de l'AFM1 sur cartouche C 18 sep Pak :

Mode opératoire :

- Prélavage de la cartouche par 5 ml eau puis 5 ml acétonitrile.
- Echantillon (10 ml lait + 25 ml eau) transféré sur la cartouche.

- Lavage avec 5 ml eau puis avec 20 ml acétonitrile à 10 % dans l'eau.
- Elution de l'AFM1 par 4 ml acétonitrile 30 % dans l'eau.
- Injection de l'éluat en HPLC aux conditions suivantes :
 - . colonne : Lichrosorb RP 18, 5 μ m
 - . solvant : acétonitrile 28 % dans l'eau
 - . spectrofluorimètre : λ Excitation = 365 nm
 λ Emission = filtre "cut off".
 (>385nm)

Au cours des essais préliminaires effectués sur l'AFM1 dans l'eau, il a été démontré que l'injection telle qu'elle de l'éluat (4 ml acétonitrile) ne permettait pas la détection de faible teneur d'Aflatoxine. Il faut donc le concentrer, or l'Acétonitrile n'étant pas très facile à évaporer, il a été remplacé par le méthanol qui est évaporé et repris par 200 μ l de ce même solvant.

Des pertes ont été démontrées au niveau du lavage à l'acétonitrile à 10 % dans l'eau. Il a donc fallu éliminer cette étape.

L'éluat méthanolique obtenu après omission du stade de lavage à l'acétonitrile 10 % donne un chromatogramme où le pic d'AFM1 est masqué par les pics d'impuretés. Ce résultat n'est pas modifié lorsqu'on remplace le méthanol par l'Acétonitrile à 30 %. DONC LA PERSISTANCE DES PICS D'IMPURETES EST CERTAINEMENT DUE A L'OMISSION DE LA PHASE DE LAVAGE A L'ACETONITRILE 10 %. Fig 8

En réincorporant l'acétonitrile dans le protocole mais seulement à 5 % au lieu de 10 %, on s'aperçoit que non seulement il n'élué pas l'Aflatoxine mais il n'élimine pas non plus les impuretés : LES LAVAGES PARAISSENT DONC INEFFICACES POUR ELUER LES IMPURETES DU LAIT SANS ELUER L'AFLATOXINE. Fig 9 .

III-2-2-2- Modification de la méthode de purification :

Application de la méthode de FREMY (25)

Il s'agit ici d'une cartouche de silice sep pak (phase normale).

Après extraction, le filtrat est concentré puis transféré sur la cartouche. Le lavage s'effectue avec de l'hexane (2ml) puis de l'éther (2ml) avant l'élution de l'AFM1 par 3 ml de chloroforme - méthanol (9 + 1).

Dans un premier temps, la cartouche a été remplacée par une petite colonne de silice fabriquée par nos soins (pipette pasteur + laine de verre + silice). Une solution chloroformique d'AFM1 est transférée sur la colonne et traitée selon le mode opératoire. Après injection en HPLC rien n'a pu être détecté, ni dans les deux solvants de lavage, ni dans le solvant d'élution : L'AFM1 N'A PAS ETE RETENUE.

L'utilisation de véritable cartouche de silice sep pak donne le même résultat.

Les résultats obtenus avec ces systèmes d'extraction et de purification n'ayant pas été satisfaisants, il a fallu envisager d'autres modifications.

III-2-2-3- Modification du solvant d'élution HPLC

B. D'ARGENTRE (21) a utilisé le solvant de WINTERLIN (Acétonitrile 28 % dans l'eau) mais il n'a pas été possible de séparer le pic d'AFM1 des pics d'impuretés du lait. Il a donc fallu modifier la teneur en acétonitrile comme suit :

- Acétonitrile 20 % dans l'eau avec un débit de 1 ml/mn :

Le temps de rétention de l'AFM1 est très long : supérieur à 20 mn. Donc inutilisable.

- Acétonitrile 27 % : 1 ml/mn :

Amélioration insuffisante par rapport au solvant initial.

- Acétonitrile 26 % 1 ml/mn :

Le pic d'AFM1 se sépare de ceux des impuretés du lait mais le retour à la ligne de base reste mauvais.

- Acétonitrile 25 % 1 ml/mn :

Il permet une séparation acceptable du pic d'AFM1. (Fig 10)

III-2-2-4- Discussion :

Si l'utilisation des cartouches de purification n'a pu permettre les résultats escomptés, c'est parce que l'extraction directe de l'Aflatoxine par les solvants appropriés (méthanol, acétonitrile, chloroforme etc...) n'est sans doute pas la bonne méthode d'autant plus que le lait est très riche en protéines et en lipides. Il faudrait donc procéder autrement en précipitant par exemple davantage les protéines du lait ou en utilisant un système de délipidation.

FIG 8 :

HPLC:

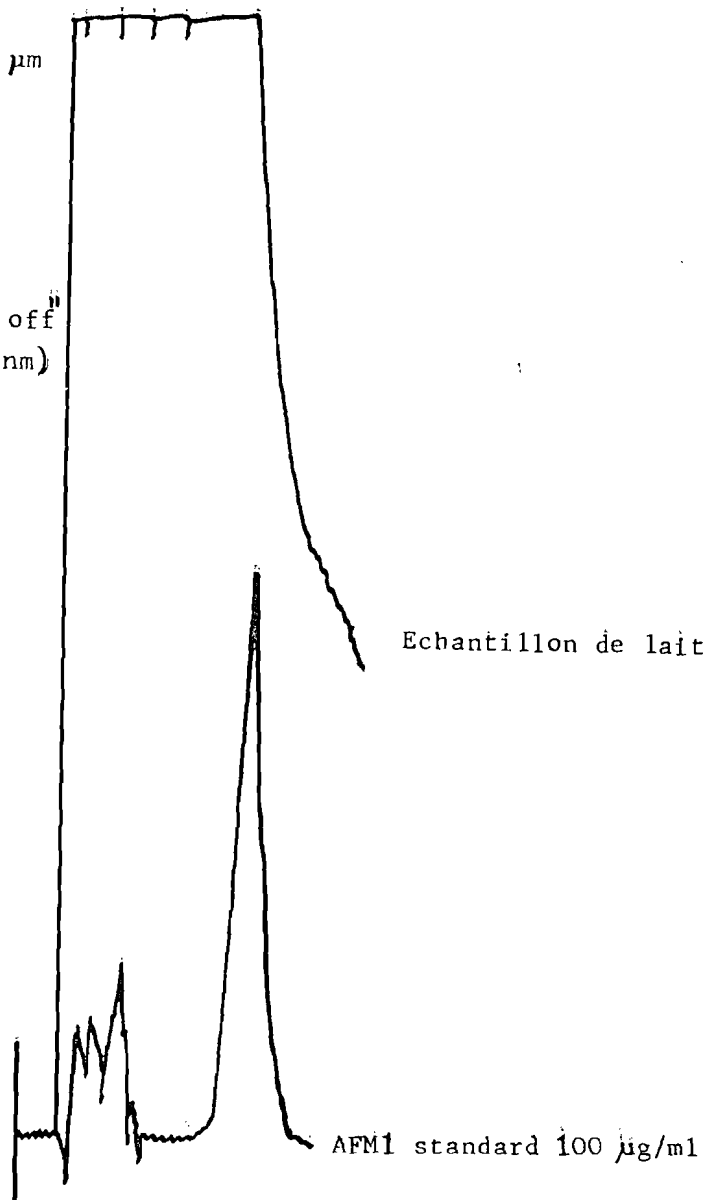
Lichrosorb RP 18; 5 μ m

Acetonitrile-eau

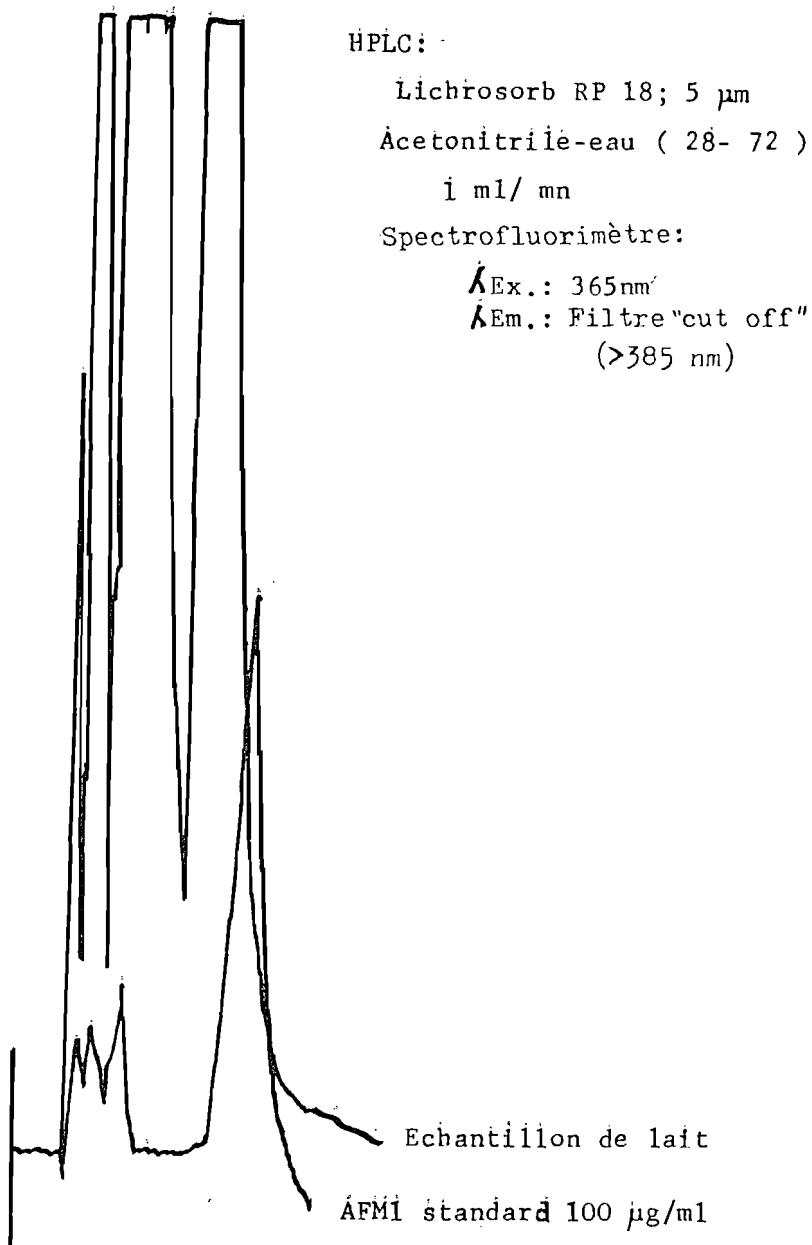
28 72

1ml/mn

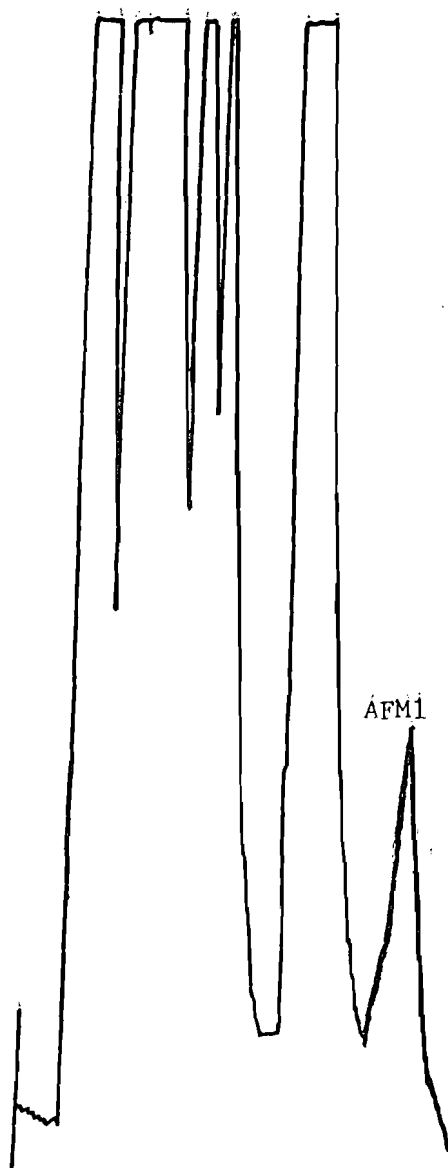
Spectrofluorimètre:

- λ Ex.: 365 nm- λ Em.: Filtre "Cut off"
(>385 nm)

EXTRACTION SANS LAVAGE A L'ACETO-
NITRILE 10%.

FIG 9 :

EXTRACTION APRES LAVAGE A L ACETONI-
TRILE 5°/° ET PASSAGE SUR UNE SECONDE
CARTOUCHE

FIG 10 :

HPLC:

Lichrosorb RP 18; 5 μ m

Acetonitrile-eau (25 - 75)

1 ml/ mn

Spectrofluorimètre:

 λ Ex.: 365 nm λ Em.: Filtre "cut off"

(>385 nm)

AFM1

SOLVANT MODIFIE : ACETONITRILE 25%.

III-2-3- METHODES D'EXTRACTION BASEES SUR LA PRECIPITATION DES
PROTEINES DU LAIT :

EXPERIENCES PERSONNELLES

La plupart des méthodes bibliographiques (CCM, HPLC) ont utilisé des agents précipitants dont l'acétate de plomb, le sulfate de cadmium, le méthanol.

L'application rigoureuse du protocole original nécessitant un travail laborieux, long et coûteux, nous essaierons de raccourcir les opérations afin de répondre à notre objectif.

III-2-3-1- Application des techniques d'extraction existantes :

III-2-3-1-1- Précipitation à l'acétate de plomb : méthode de PONS (49)

a) précipitation directe :

100 ml lait + 10 g hyflosupercel ou célite 545
+ 300 ml acétone
+ 20 ml solution d'acétate de plomb

On obtient un filtrat de couleur jaunâtre.

Filtrat + 100 ml Hexane puis agitation à l'aide d'un mixeur.

On obtient une solution visqueuse ressemblant à du lait :

IL EST IMPOSSIBLE DE SEPARER LA PHASE HEXANIQUE.

b) Application intégrale de la méthode de PONS :

100 ml lait
+ 10 g hyflosupercel ou célite 545
+ 300 ml acétone
Agitation puis filtration
Prendre 275 ml du filtrat
Ajouter 200 ml eau distillée puis 20 ml solution d'acétate
de plomb.

Agiter, laisser flocculer 5 mn.

Ajouter 10 g Hyflosupercel ou célite

Mélanger, filtrer.

On obtient un filtrat limpide mais il n'y a pas eu de vraie précipitation, le résidu sur le filtre n'étant constitué que par de la célite ou hyflosupercel.

Le lavage par l'hexane n'entraîne pas d'émulsion malgré l'agitation à l'aide du mixeur.

Remarque: Il est donc indispensable d'utiliser la procédure de PONS dans son intégralité (double filtration) malheureusement, cela allonge le temps d'extraction et nécessite beaucoup de réactifs, donc coûteux.

Le même résultat est obtenu avec les méthodes de STUBBLEFIELD(55) et de GREGORY(28).

III-2-3-1-2- Précipitation au sulfate de cadmium : méthode de TUINSTRA(59)

60 ml lait chauffé 15 mn dans l'eau bouillante

+ 15 ml eau distillée

+ 10 ml solution de sulfate de cadmium 10 %

Mélanger, centrifuger.

Filtrer 100 ml de surnageant sur papier filtre, on obtient un filtrat jaunâtre.

L'addition de l'hexane donne un liquide pâteux blanchâtre ressemblant à celui obtenu avec l'acétate de plomb.

IL EST IMPOSSIBLE DE SEPARER LA PHASE HEXANIQUE.

L'application intégrale de la procédure de TUINSTRA (omission du lavage à l'hexane) donne une masse grasseuse ou protéique à l'interface chloroforme-eau.

III-2-3-1-3- Précipitation au méthanol :

Elle n'est pas plus efficace que les méthodes précédentes, la précipitation obtenue est faible et donne un filtrat opalescent entraînant une émulsion difficile à casser lors du lavage à l'hexane.

III-2-3-4- Vérification de la pureté des extraits obtenus

Pour éviter l'émulsion provoquée par le lavage à l'hexane, nous avons pratiqué une double filtration comme le préconisent les méthodes de PONS, STUBBLEFIELD, et GREGORY. Les extraits chloroformiques obtenus ont été évaporés puis repris par le méthanol pour être injectés en HPLC dans les conditions suivantes :

- colonne Lichrosorb RP 18, 5 μ m
- solvant : acétonitrile 25 % à 1 ml/mn
- spectrofluorimètre : λ excitation 365 nm
 λ émission = Filtre "cut off" (>385 nm)

Le chromatogramme obtenu montre une saturation de la colonne. Il est semblable à celui de la fig 8. Il sera aussi indiqué ultérieurement.

Le pic d'aflatoxine M1 est masqué par les impuretés du lait. Il se pose donc le problème de purification.

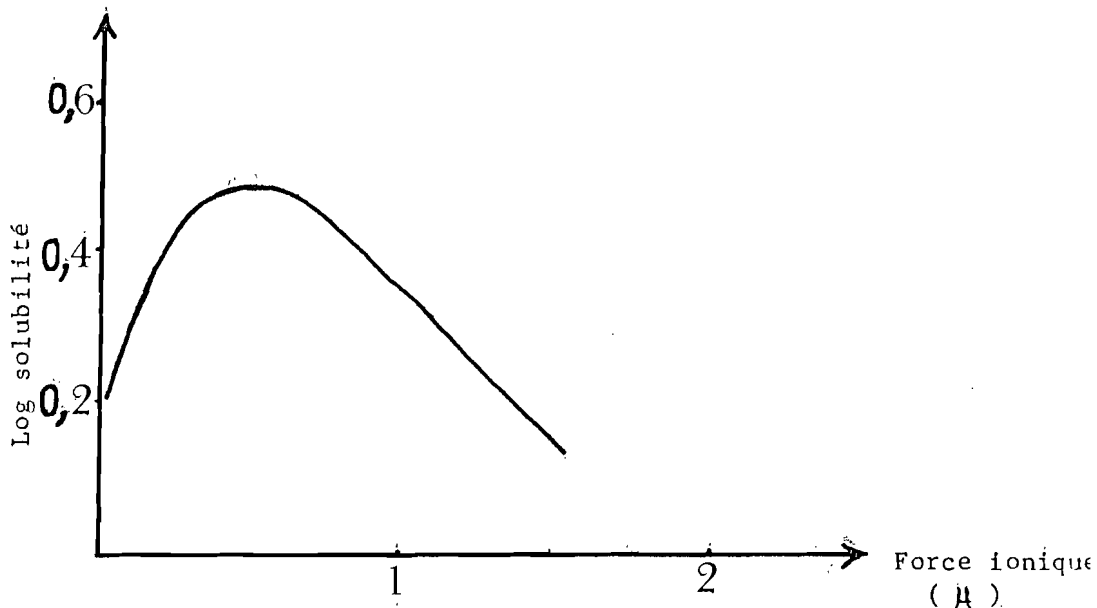
Les auteurs préconisent une purification sur colonne chromatographique, ce qui allonge la durée de l'opération et augmente le coût de l'analyse.

IL FAUT DONC ESSAYER D'AMELIORER LES METHODES DE PRECIPITATION

III-2-4- AMELIORATION DE LA PRECIPITATION DES PROTEINES DU LAIT :

Des études biochimiques (38) ont montré que les sels neutres en particulier les sels d'ions divalents ($Mg Cl_2$ ou $(NH_4)_2 SO_4$) diminuent la solubilité des protéines lorsqu'ils sont en concentration élevée dans le milieu (force ionique augmentée). Lorsque cette force ionique est suffisamment élevée, la protéine peut être presque complètement précipitée : c'est l'effet du relargage ou "salting out" par opposition au "salting in" (dissolution des protéines : cas de basse force ionique).

Ex : solubilité de la carbonyl hémoglobine :



Effet d'un sel neutre (K_2SO_4) sur la solubilité de la carbonyl hémoglobine à son pH isoélectrique :

A basse force ionique, la solubilité de la protéine augmente (salting in) ;

A concentration en sels élevée, la solubilité de la protéine diminue (salting out ou relargage) :

III-2-4- 1- Choix d'un nouvel agent précipitant :

En biochimie le sulfate d'ammonium est utilisé préférentiellement pour le relargage à cause de sa bonne solubilité dans l'eau et de sa force ionique élevée (38) or son utilisation dans la technique de GREGORY (28) n'a apporté aucune amélioration. Nous avons donc pensé utiliser un agent précipitant différent.

III-2-4-1-1- Le sulfate de zinc

C'est un sel neutre d'ion divalent donc utilisable en principe dans le phénomène de relargage.

Préparation de la solution de sulfate de zinc :

Sulfate de zinc cristallisé (à 7 molécules d'eau) \longrightarrow PM \approx 287
soit 28,7 g/100 ml d'eau. Mais nous avons utilisé en définitive,
28 g pour 100 ml d'eau.

Expérience :

- 10 ml lait + 15 ml eau distillée.

Addition de volumes croissants de solution de sulfate de zinc
dans chaque échantillon.

Après agitation, on observe des précipitations dans chaque
flacon. Ces précipitations sont apparemment différentes et leur
intensité semble proportionnelle au volume de la solution de sulfate
de zinc ajoutée. Toutes ces précipitations se sont réalisées au pH 4-5.

L'addition de l'hexane au filtrat provoque une émulsion difficile
à casser après agitation à l'aide d'un mixeur.

DONC LA PRÉCIPITATION PAR LE SULFATE DE ZINC SEUL EST INSUF-
FISANTE MALGRE SON INTENSITE PLUS FORTE QUE CELLE DES AGENTS PRÉCIPITANTS
DEJA ETUDIÉS. IL FAUT ALORS POURSUIVRE LA TENTATIVE D'AMÉLIORATION.

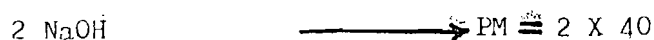
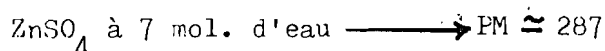
III-2-4-1-2- Action combinée du sulfate de zinc et de la soude

Il semble que la plupart des protéines aient leur solubilité
diminuée à leur point isoélectrique.

Ex : la β globuline qui est une protéine du lait en présence de
NaCl a une solubilité minimale au pH 5,2 - 5,3 (38) .

Nous avons alors tenté de jouer sur le pH du milieu en prenant comme
base la technique classique de défécation utilisée dans le dosage de l'urée
sanguine et de la glycémie (37). Cette technique préconisait l'emploi de
solutions de sulfate de zinc à 10% et de soude à 22 %, mais nous avons
modifié ces proportions pour répondre à la logique de l'équation suivante :





Pour 100 ml il faut donc 8 g de soude en pastilles.

Les solutions finales sont les suivantes :

solution de sulfate de zinc 28 % dans l'eau

solution de soude 8 % dans l'eau

La détermination des proportions à utiliser n'a pas été facile :

A volume égal, ces deux réactifs n'apportent aucune amélioration.

Nous avons alors procédé par tâtonnement ; et seule l'addition

de solution de sulfate de zinc (7 ml) et de solution de soude

(4 ml) a permis une plus forte précipitation (pH = 4-5) et une

élimination des risques d'émulsion lors du lavage à l'hexane.

Cette méthode prometteuse doit maintenant être vérifiée.

III-2-4-1-3- Vérification de cette nouvelle technique de précipitation

Après extraction de l'AFM1 par cette méthode, l'extrait obtenu doit être injecté en HPLC pour comparer le chromatogramme avec ceux des méthodes déjà étudiées.

10 ml lait + 50 ng AFM1 + 15 ml eau

+ 7 ml solution sulfate de zinc

+ 4 ml solution NaOH

Filtrat lavé à l'hexane (2 X 50 ml)

La phase hexanique est éliminée.

L'AFM1 est éluée par 3 X 50 ml de chloroforme (préférée au méthanol parcequ'il n'est pas miscible à l'eau et il est facilement évaporable).

Les phases chloroformiques sont recueillies séparément.

Après concentration et évaporation à sec ; chaque fraction est reprise par 100 µl de Méthanol et injectée en HPLC dans les mêmes conditions que précédemment.

Résultats :

On obtient un chromatogramme comparable à celui des extraits purifiés sur cartouche C 18 sep pak, cf. fig 10 page 43.

Les deux premières fractions contiennent l'Aflatoxine M1; la troisième ne contenant pratiquement rien.

ON ARRIVE A AVOIR UN RESULTAT ENCOURAGEANT SANS PURIFICATION SUR CARTOUCHE.

III-2-4-1-4- Choix du volume de l'échantillon

Nous voulons obtenir une limite de détection d'environ 10 ppt donc 10 ml de lait devront contenir 0,1 ng d'AFM1.

0,1 ng d'AFM1 ajoutée à 10 ml de lait; n'a pu être détectée après extraction bien que les 3 phases chloroformiques aient été réunies.

Nous avons donc doublé le volume de l'échantillon de même que ceux des agents précipitants, les volumes d'hexane et de chloroforme n'ont pas été modifiés. Après extraction, on obtient effectivement un pic d'AFM1.

Remarque :

Un trop grand volume d'échantillon est difficilement maniable et pose le problème de purification.

III-2-4-1-5- Etude du rendement d'extraction :

20 ml lait + 1 ng AFM1

Lors du lavage du filtrat par l'hexane (2 X 50 ml) la phase hexanique (supérieure) a été éliminée par écoulement après récupération de la phase aqueuse :

Le rendement obtenu se situait entre 50 et 60 % : CETTE TECHNIQUE PROVOQUE DONC DES PERTES IMPORTANTES.

Nous avons alors procédé à l'élimination de cette phase hexanique sous trompe à vide ; on évite ainsi l'écoulement. Les essais effectués sur 4 échantillons dans ces conditions donnent un rendement moyen de 81 % ce qui semble assez satisfaisant. Il se pose cependant le problème de la résolution insuffisante du pic d'AFM1 et de la saturation fréquente de la colonne.

III-2-4-1-6- Description détaillée de la présente méthode d'extraction

Cette méthode est d'autant plus intéressante qu'elle nous semble facile; moins longue (omission de la phase de purification sur colonne chromatographique ou cartouche). Contrairement aux méthodes préexistantes, elle associe donc à la fois L'EXTRACTION ET LA PURIFICATION. Elle est applicable à tous les produits laitiers hormis la petite différence au niveau de la préparation de l'échantillon:

a) Principe

Les protéines du lait ou produits laitiers sont précipitées par le sulfate de zinc en présence de soude ($Zn(OH)_2$). Le filtrat clair et limpide obtenu est lavé à l'hexane et l'AFMI est éluée par le chloroforme. L'éluat concentré et évaporé à sec est repris par le méthanol pour être passé en HPLC phase inversée (Licrosorb RP 18, 5 μ m) à détection fluorimétrique (Excitation 365 nm, Emission 415 nm remplacée par un filtre "Cut off" $\lambda > 385$ nm).

b) Matériel et réactifs utilisés :

- Erlen à bouchon rodé
- ampoule à décanter 250 à 500 ml
- ballon rodé 250 ml
- broyeur (mixeur) : ILA CX
- évaporateur rotatif
- papier Whatman n° 1

Produits et réactifs :

- sulfate de sodium anhydre
- solution de sulfate de zinc (Merck) : 28 g dans 100 ml d'eau
- solution d'hydroxyde de sodium (Prolabo) : 8 g dans 100 ml d'eau
- hexane (Prolabo)
- chloroforme (Amilabo)
- méthanol (Merck)
- solution chloroformique d'AFMI standard 10 μ g/ml (Sigma)

c) Préparation de l'échantillon :

- lait liquide : 20 ml + 30 ml eau. Agiter

- lait en poudre :

5 g de lait

100 ml d'eau

agiter

chauffer quelques minutes au bain-marie
pour bien dissoudre.

- Fromage :

5 g triturés dans un mortier pour obtenir
une pâte homogène

ajouter une petite quantité d'eau tiède
au début (préparer auparavant environ 90
ml d'eau tiède dans une pissette)

continuer la trituration pour bien dissoudre
la pâte dans l'eau.

rajouter un peu d'eau et continuer à mélanger.
Si le mélange est homogène, rincer le pilon à
l'aide de l'eau de la pissette en prenant
soin de bien récupérer l'eau du rinçage dans
le mortier.

Verser le contenu du mortier dans un Erlen
puis rincer le mortier à l'aide de l'eau de
la pissette.

Dès que l'échantillon est entièrement récu-
péré, il faut l'agiter vigoureusement puis
le porter quelques minutes au bain-marie
pour préserver l'homogénéisation.

d) Extraction-purification :

A l'échantillon préparé, ajouter 14 ml de solution de
sulfate de zinc. Agiter vigoureusement avant de rajouter 8 ml de
solution de soude. Agiter légèrement pour ne pas casser la pré-
cipitation. Filtrer sur buchner à travers un papier filtre What-
man n° 1 en prenant soin de bien laver le résidu.

Le filtrat obtenu doit être CLAIR ET LIMPIDE. Laver le filtrat avec 2 fois 50 ml d'hexane en agitant à chaque fois à l'aide d'un mixeur ultra-rapide pendant une minute avant de transférer dans une ampoule à décanter. Laisser reposer une minute puis éliminer la phase supérieure (hexane) sous trompe à vide.

Pour extraire l'aflatoxine M₁, ajouter 50 ml de chloroforme. Agiter une minute à l'aide du mixeur ultra-rapide; transvaser dans l'ampoule à décanter (toujours la même) puis récupérer la phase chloroformique (inférieure) dans un ballon rodé de 250 ml par filtration sur un lit de sulfate de sodium anhydre. Recommencer l'opération une seconde fois puis une troisième fois, cette dernière partie servant de rinçage.

La phase chloroformique est ensuite concentrée sous vide à environ 1 ml à l'aide d'un évaporateur rotatif. L'extrait concentré est transféré dans un petit flacon en prenant soin de bien rincer le ballon avec 5 ml de chloroforme. L'extrait concentré est évaporé à sec sous courant d'azote. Le résidu sec repris par 100 µl de méthanol est prêt à l'injection en HPLC.

L'OPERATION DURE 30 A 35 mn :

III-3- DOSAGE PROPREMENT DIT DE L'AFM1

III-3-1- Introduction :

Si la chromatographie liquide à haute performance apporte une amélioration par rapport à la chromatographie sur couche mince, il subsiste encore le problème de la lenteur de l'analyse pour les méthodes utilisant des colonnes de purification de même que le manque de sensibilité (environ 0,1 ppb). Quant aux méthodes reconnues rapides par l'utilisation de cartouche de purification (25, 62), elles posent d'une part le problème de la résolution du pic d'AFM1 et d'autre part le problème de la sensibilité ;

La présente méthode se caractérise par sa bonne sensibilité et sa bonne résolution grâce au choix judicieux du solvant d'éluion (phase mobile).

III-3-2- Appareil utilisé :

L'appareil utilisé est du type Kontron aux caractéristiques suivantes :

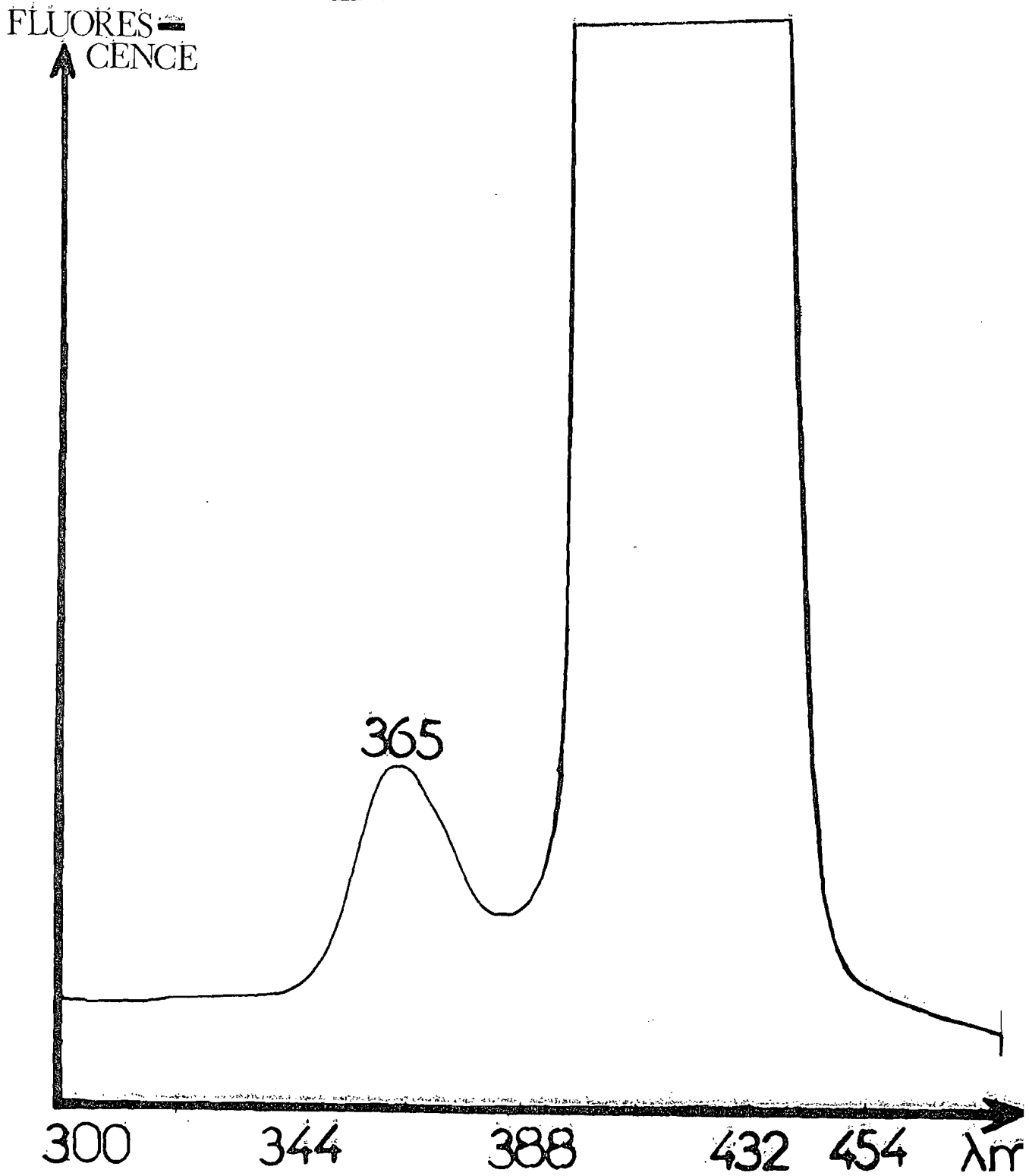
- longueurs d'onde :

Elles ont été déterminées par notre appareil équipé d'un système permettant de tracer des spectres Fig 11 et 12

Les valeurs obtenues sont les suivantes :

. Longueur d'onde d'excitation = 365 nm
.. Longueur d'onde d'émission = 415 nm mais cette dernière a été remplacée par un filtre "cut off" qui détecte la fluorescence au delà de 385 nm. Ce dispositif permet d'augmenter la sensibilité en multipliant la réponse du détecteur par 7 environ par rapport à 415 nm (Fig 13) mais son inconvénient est la baisse de la spécificité.

- colonne de séparation (voir chapitre III-1-2-3).

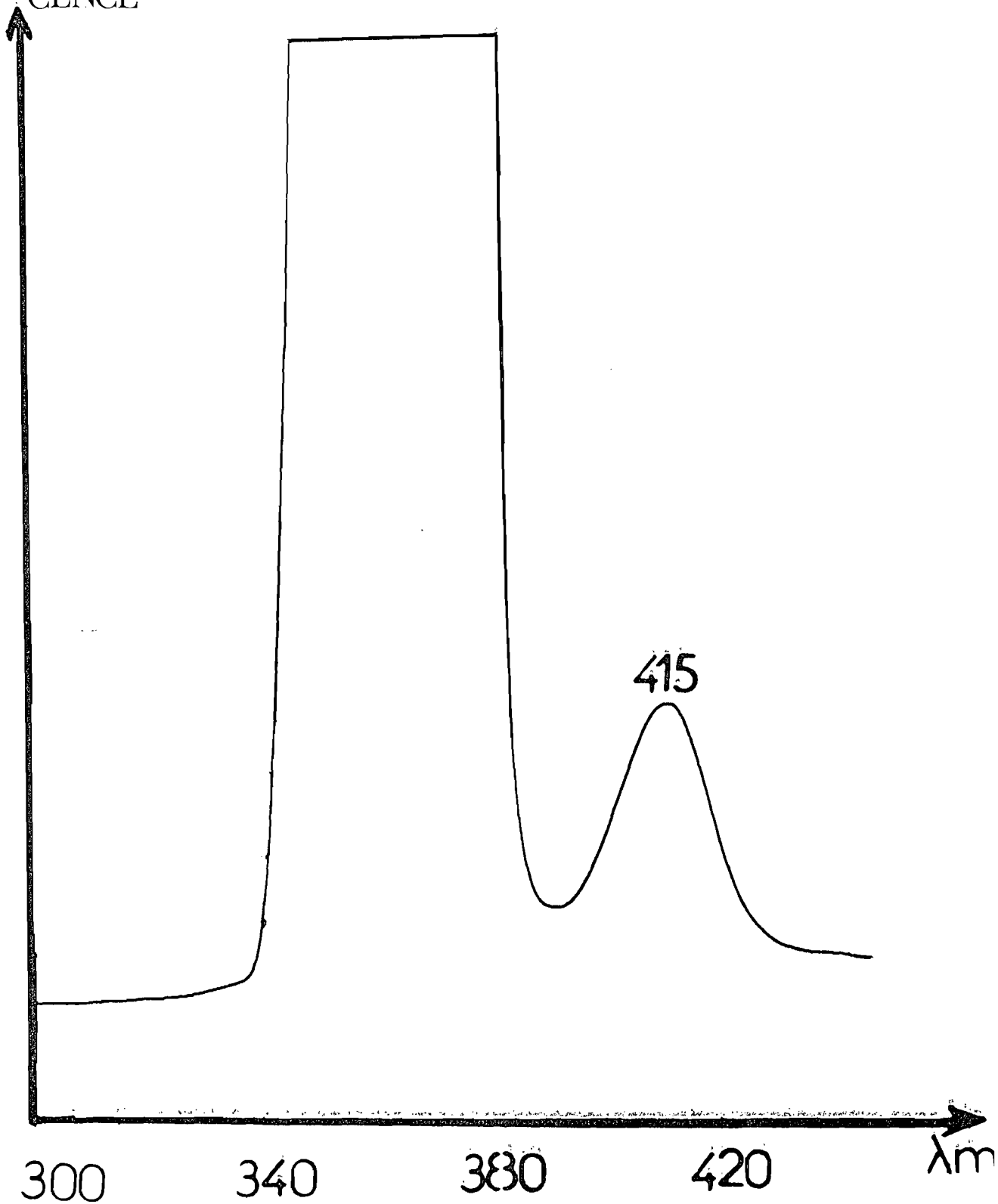
FIG11 :

SPECTRE D'EXCITATION DE L'AFM₁ EN
SOLUTION METHANOLIQUE

FLUORESCENCE

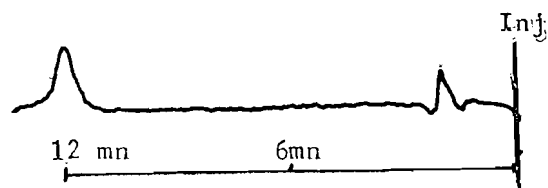
FIG 12 :

56



SPECTRE D'EMISSION DE L'AFM₁ EN SOLUTION METHANOLIQUE

FIG 13 :



Solution standard d'AFMI 100 ng/ml

HPLC :

Lichrosorb RP 18, 5 μ m

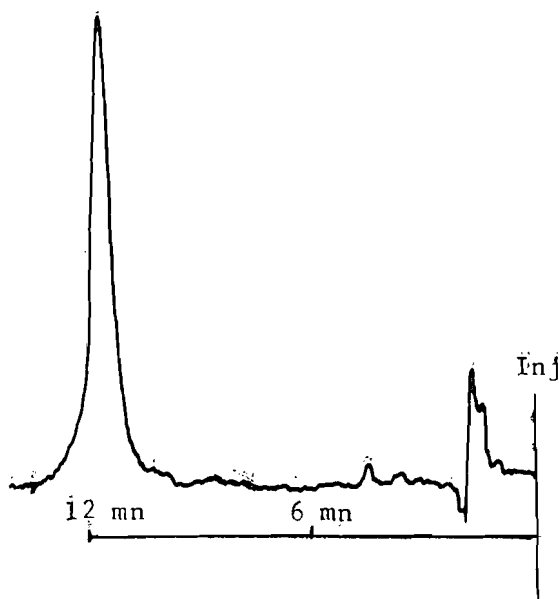
Acétonitrile-méthanol-eau (20-5-75) 1 ml/mn

Spectrofluorimètre :

λ_{Ex} = 365 nm

λ_{Em} = 415 nm

Atténuation = MED/10/25



Solution standard d'AFMI 100 ng/ml

HPLC :

Mêmes conditions excepté λ_{Em} = Filtre "cut off"

(>385 nm)

TRACES OBTENUS AVEC ET SANS FILTRE

III-3-3- Solvant d'élution :

Au cours de son étude, B. D'ARGENTRE (21) a montré que pour permettre la séparation du pic d'AFM1, le solvant de Winterlin devrait être ramené à 25 % d'Acétonitrile dans l'eau. Nous avons utilisé cette même proportion pour tester l'efficacité de notre technique d'extraction. C'est ainsi que nous avons remarqué au cours de l'étude que le problème de la séparation du pic d'AFM1 n'était pas suffisamment résolu surtout lorsque la colonne avait servi un certain nombre de fois. De plus, la colonne se saturait constamment d'où la nécessité de la nettoyer au méthanol toutes les 2 injections d'extrait de lait, ce qui réduit la performance de la technique. La colonne devient même inutilisable après vingt dosages environ. Fig 14

Du fait que le méthanol servait de solvant de nettoyage, nous avons pensé l'incorporer dans le solvant d'élution; c'est pourquoi nous avons d'abord testé le solvant de GREGORY (Acétonitrile-méthanol-eau : 25,2 - 8,8 - 66) (28) qui n'a apporté aucune amélioration (Fig15). Nous avons alors modifié les proportions des réactifs.

Conditions HPLC :

colonne : lichrosorb RP 18, 5 μ m

spectrofluorimètre: λ excitation : 365 nm

λ émission : Filtre "cut off" (>385 nm)

solvant : à déterminer?

Après injection d'une solution standard d'AFM1 (10 μ g/ml); on injecte l'extrait de lait.

La composition du solvant (1ml/mn) et les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau ci-dessous :

Acétonitrile (ml)	Méthanol (ml)	eau (ml)	Observations	
			Pic d'AFM1 standard	Pic d'AFM1 dans le lait.
20	1	79	très aplati	- bien séparé des pics d'impuretés. - l'écart est d'environ 3 mn - très aplati
20	2	78	encore aplati	- bien séparé - écart environ 3 mn - aplati
20	3	77	légère amélioration	- bonne séparation - légère amélioration - écart env. 2,5 mn
20	4	76	amélioré	- écart = 2,5 mn - amélioré mais la surface du pic est inférieure à celle obtenue avec acétonitrile 25 %
20	5	75	amélioré	Ecart = 2 mn surface identique à celle obtenue avec acétonitrile 25 % Fig 16

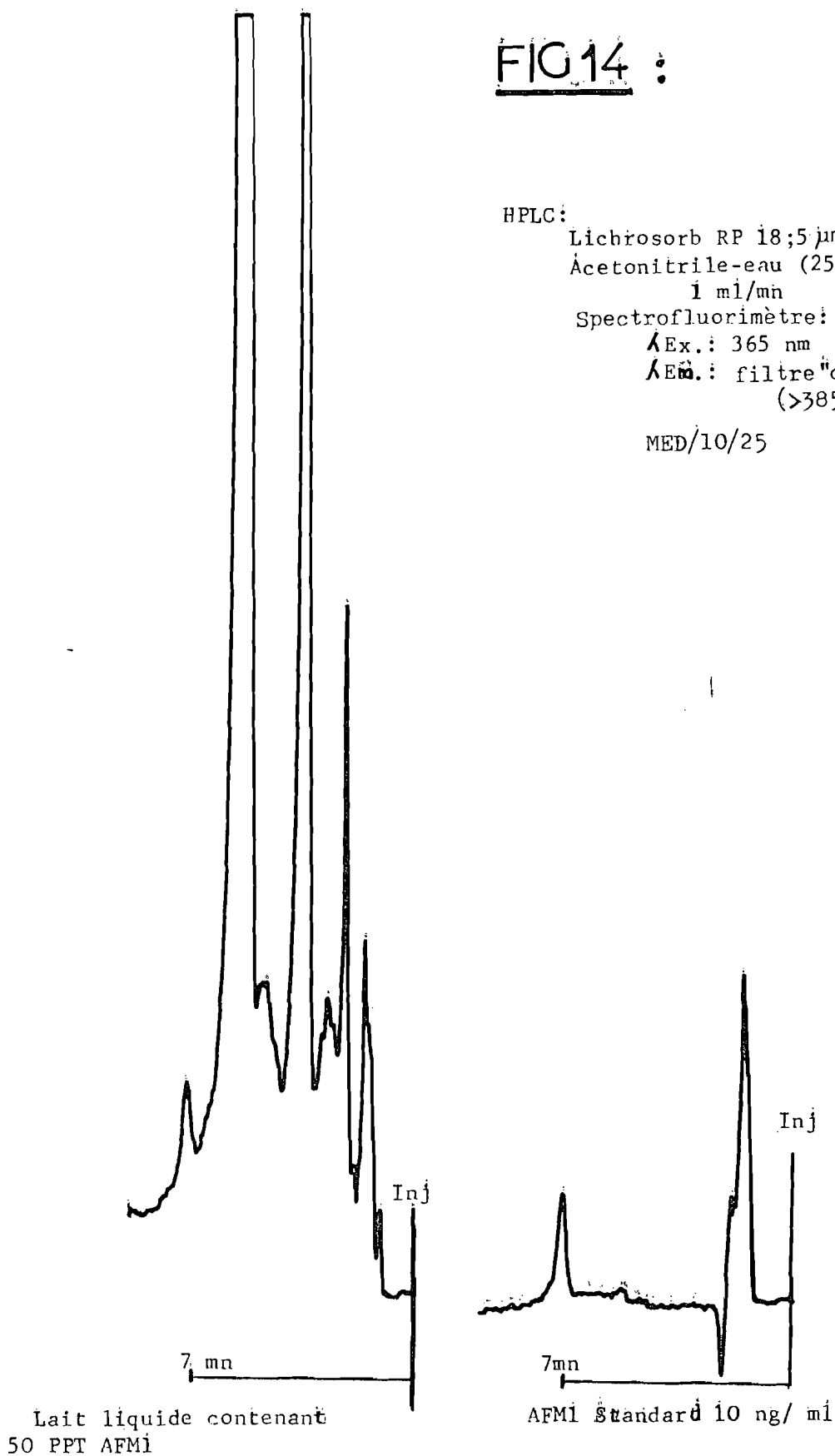
Nous retenons donc la dernière proportion. L'acétonitrile utilisé est un solvant Carlo Erba.

Remarques :

- La détermination de la composition du solvant a été facilitée par l'utilisation d'un programmeur qui a permis un mélange instantané des différents réactifs. Il faut toutefois noter que le mélange acétonitrile/méthanol a été réalisé manuellement, le programmeur ne pouvant s'adapter à plus de deux réactifs différents.
- L'augmentation du volume de méthanol a tendance à rapprocher le pic d'ATM1 de ceux des impuretés.

FIG.14 :

HPLC:
 Lichrosorb RP 18;5 μ m
 Acetonitrile-eau (25-75)
 1 ml/mn
 Spectrofluorimètre:
 $\lambda_{Ex.}$: 365 nm
 $\lambda_{Em.}$: filtre "cut off"
 (>385 nm)
 MED/10/25



TRACES OBTENUS AVEC LE SOLVANT DE WINTERLIN MODIFIE.

FIG 15 :

HPLC:

Lichrosorb RP 18; 5 μ mAcetonitrile-methanol-eau
25,2 8,8 66

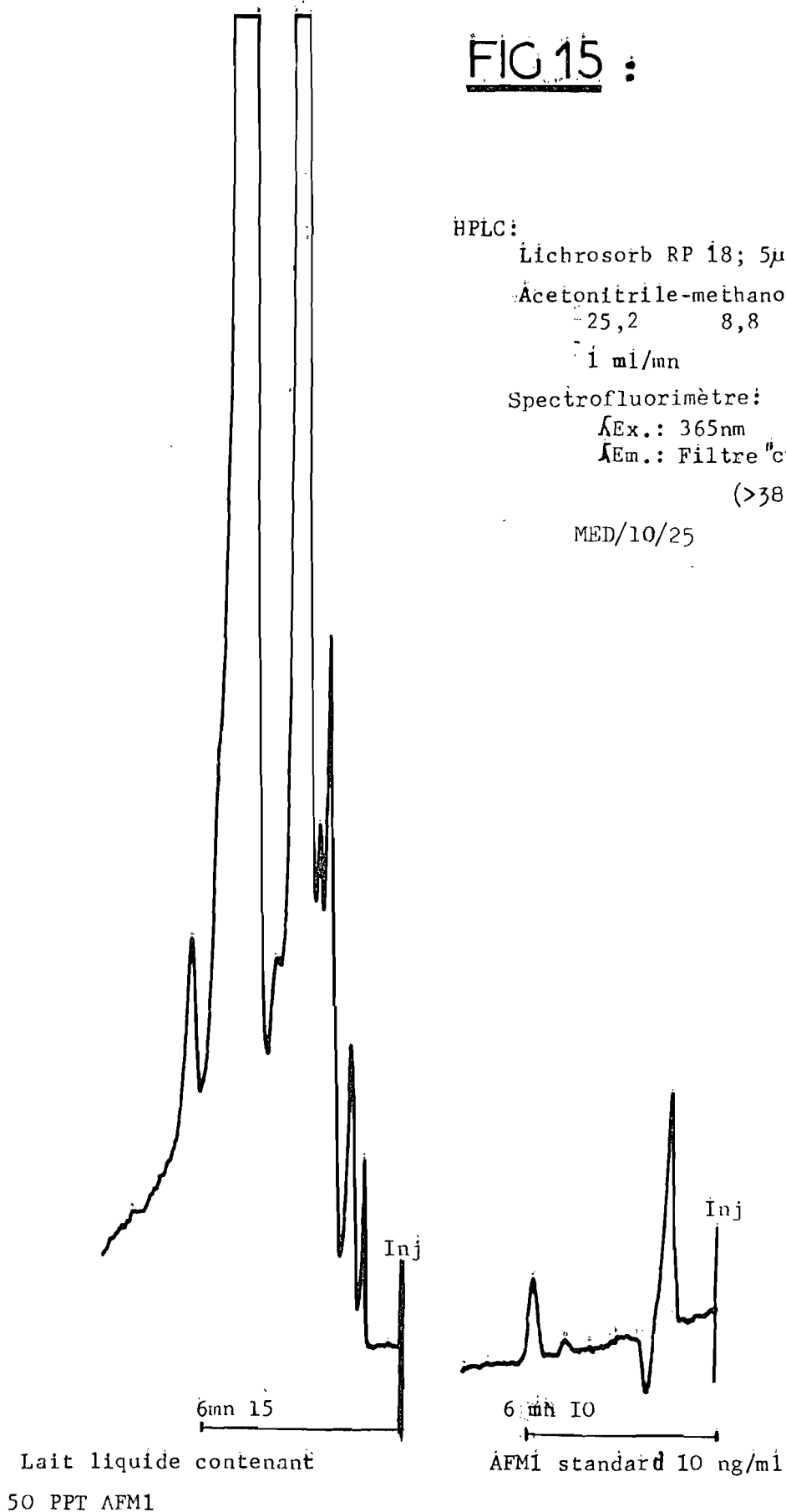
1 ml/mn

Spectrofluorimètre:

 λ Ex.: 365nm λ Em.: Filtre "cut off"

(>385 nm)

MED/10/25



TRACES OBTENUS AVEC LE SOLVANT DE
GREGORY

FIG 16 :

HPLC:

Lichrosorb RP 18; 5 μ m

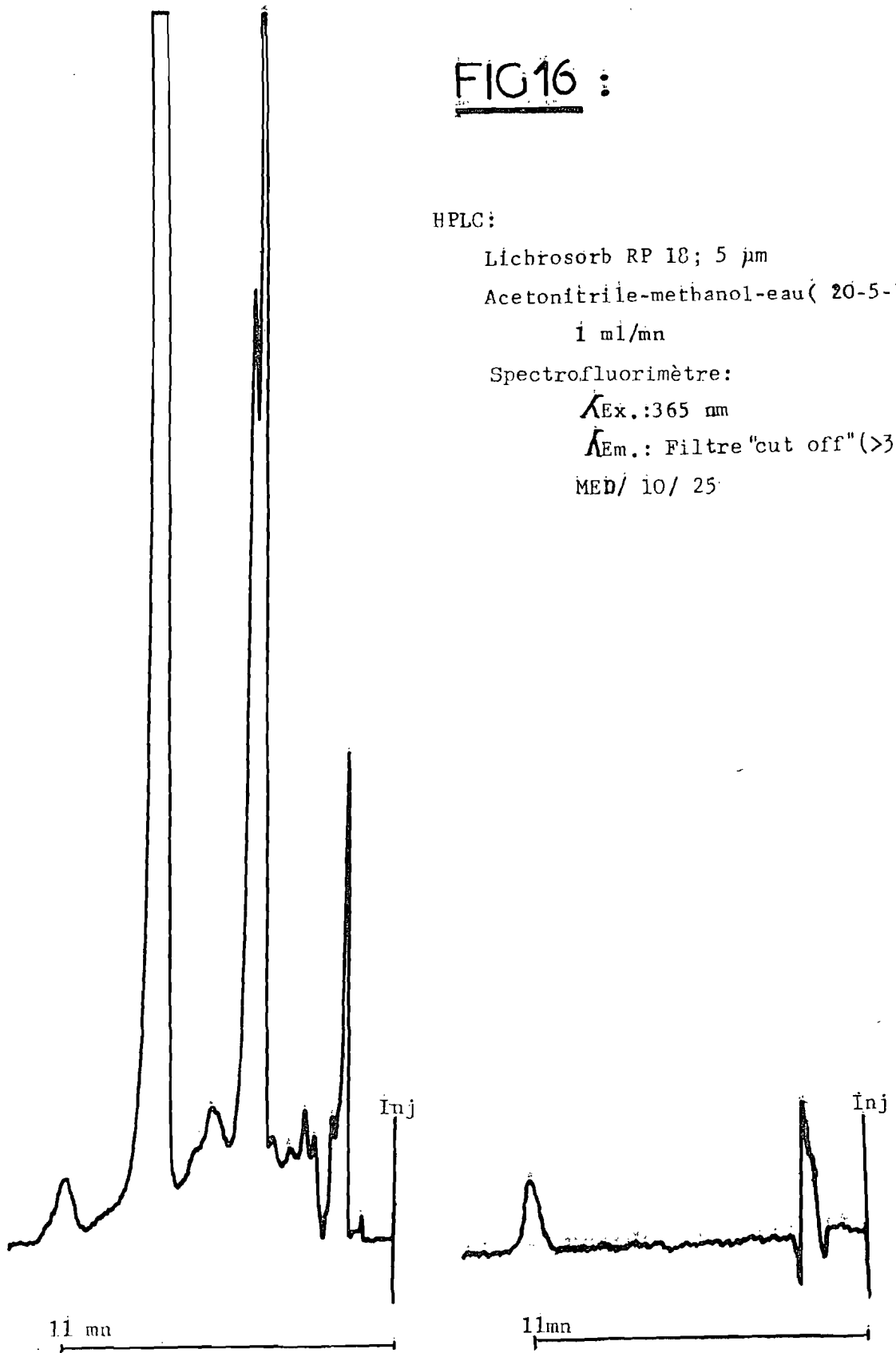
Acetonitrile-methanol-eau (20-5-75)

1 ml/mn

Spectrofluorimètre:

 $\lambda_{Ex.}$: 365 nm $\lambda_{Em.}$: Filtre "cut off" (>385 nm)

MED/ 10/ 25



Lait liquide contenant
50 PPT

AFM1 standard 10 ng/ml

TRACES OBTENUS AVEC NOTRE SOLVANT

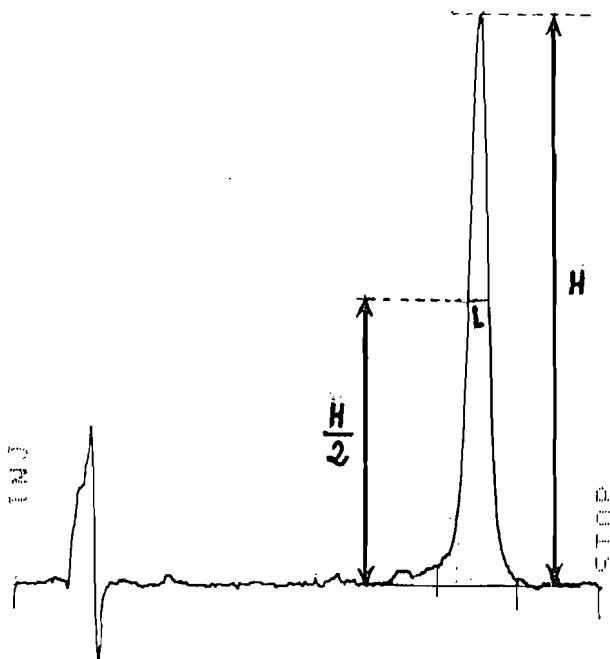
III-3-4- Résultats obtenus :

III-3-4-1- Détermination des pics :

Sur le chromatogramme, les pics sont identifiés en fonction de leur temps de rétention. Pour cela il faut au préalable, caractériser les pics provenant du solvant pur utilisé pour la solution standard de même que pour l'extrait sec. Ensuite, il faut injecter la solution standard pour déterminer le temps de rétention du pic recherché puis un échantillon témoin non contaminé (c'est à dire ne contenant pas le composé recherché). L'échantillon à doser est injecté lorsque toutes ces conditions sont réunies.

III-3-4-2- Calcul :

- La surface du pic obtenu est proportionnelle à la concentration du produit considéré.



$$S = H \times \frac{L}{2}$$

S = surface du pic

H = hauteur du pic

L = largeur à la mi-hauteur

La surface du pic se calcule soit manuellement, soit à l'aide d'un intégrateur.

- Courbe d'étalonnage :

Préparation des différentes dilutions :

Solution-mère = solution chloroformique d'AFM1 10 µg/ml

100 ml de la solution-mère + 900 ml de méthanol →

solution méthanolique d'AFM1 1 µg/ml qui servira pour les dilutions suivantes :

(solution de départ (ng/ml)	(volume utilisé (µl)	(volumé de méthanol ajouté (µl)	(titre obtenu ng/ml)
(1000	(100	(900	(100
(100	(500	(500	(50
(50	(500	(500	(25
(25	(500	(500	(12,5
(12,5	(500	(500	(6,25

Les surfaces obtenues en fonction de la concentration sont représentées dans le tableau ci-dessous et les tracés correspondants sont indiqués sur les figures 17 à 21

(concentration (en Ml (ng/ml)	(temps de rétention	(surface des pics (mm ²)	(surface théorique (mm ²)
(100	(12'32	(267,9	(—
(50	(12'34	(145,11	(267,9/2 = 133,95
(25	(12'38	(62,74	(133,95/2 = 66,96
(12,5	(12'37	(23,92	(66,96/2 = 33,49
(6,25	(12'40	(14,01	(33,49/2 = 16,74

Observation :

Il n'y a pas de différence fondamentale entre les points de dilution et les points théoriques. Cf fig.22

FIG 17 :

HPLC:

Lichrosorb RP 18; 5 μ m

Acétonitrile-méthanol-eau

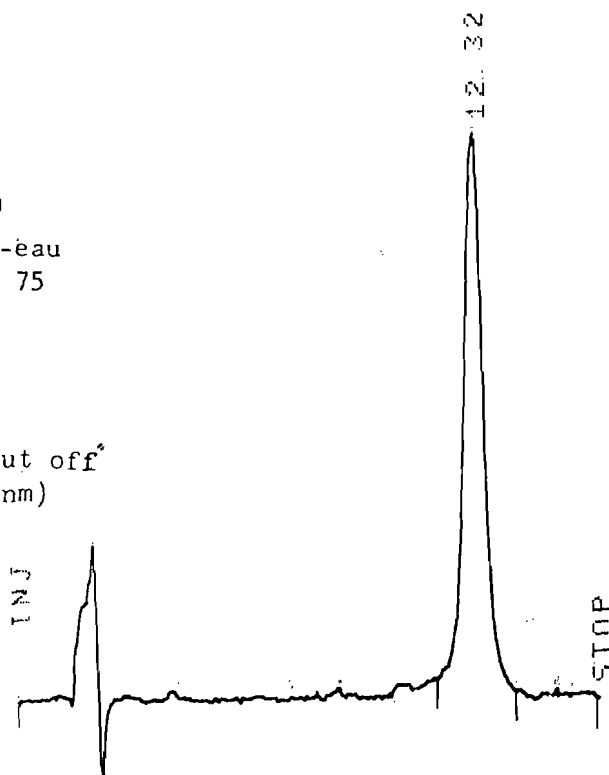
20 5 75

1 ml/mn

Spectrofluorimètre:

 $\lambda_{Ex.}$: 365 nm $\lambda_{Em.}$: Filtre "cut off"
(>385 nm)

MED/10/25



RT	TYPE	AREA	NO CAL	=> AREA %
12.32		267901		99.85

HP 3380A

DLY 8

MV/M 1 00

STOP 30

ATTN

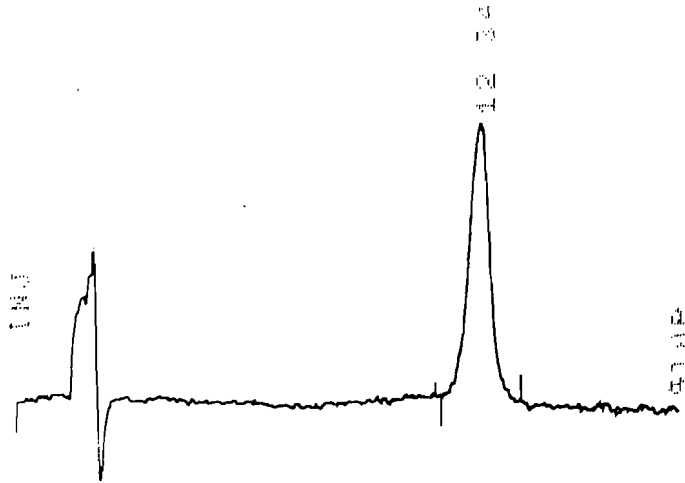
16

REJECT OFF

AFM₁ STANDARD 100 NG/ML

FIG 18 ;

HPLC: même que fig 17



RT	TYPE	AREA	NO CAL	=> AREA %
12.36		145117		99.14

HP 3300A

DLY 8

MV/M 1 00

STOP 30

ATTN

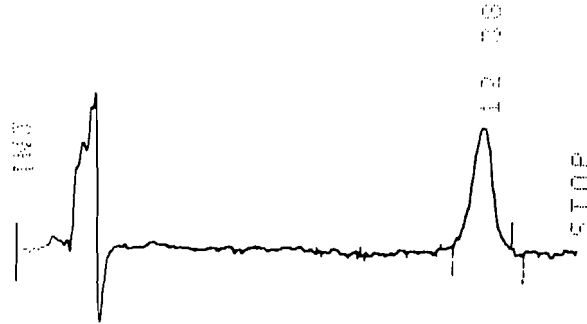
16

REJECT

AFM₁ STANDARD 50 NG/ML

FIG19 :

HPLC : cf. fig 17



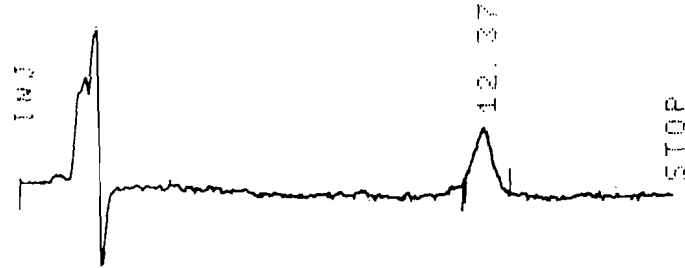
RT	TYPE	AREA	NO CAL	=> AREA %
12.30		62740		99.25

NP 33800
 DLY 3
 STOP 30
 ATTN 15
 REJECT OFF

AFM₁ STANDARD 25 NG/ML

FIG 20 :

HPLC: cf. fig 17



RT	TYPE	AREA	NO CAL	=> AREA %
12.37		23920		97.77

HP 3300A
 DLY 8
 MY/N 1 00

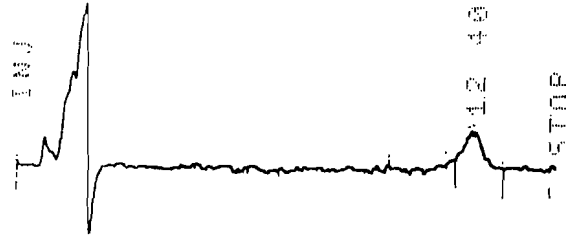
STOP 30
 ATTN 16

REJECT OFF

AFM₁ STANDARD 12,5 NG/ML

FIG 21 :

HPLC: cf.fig 17



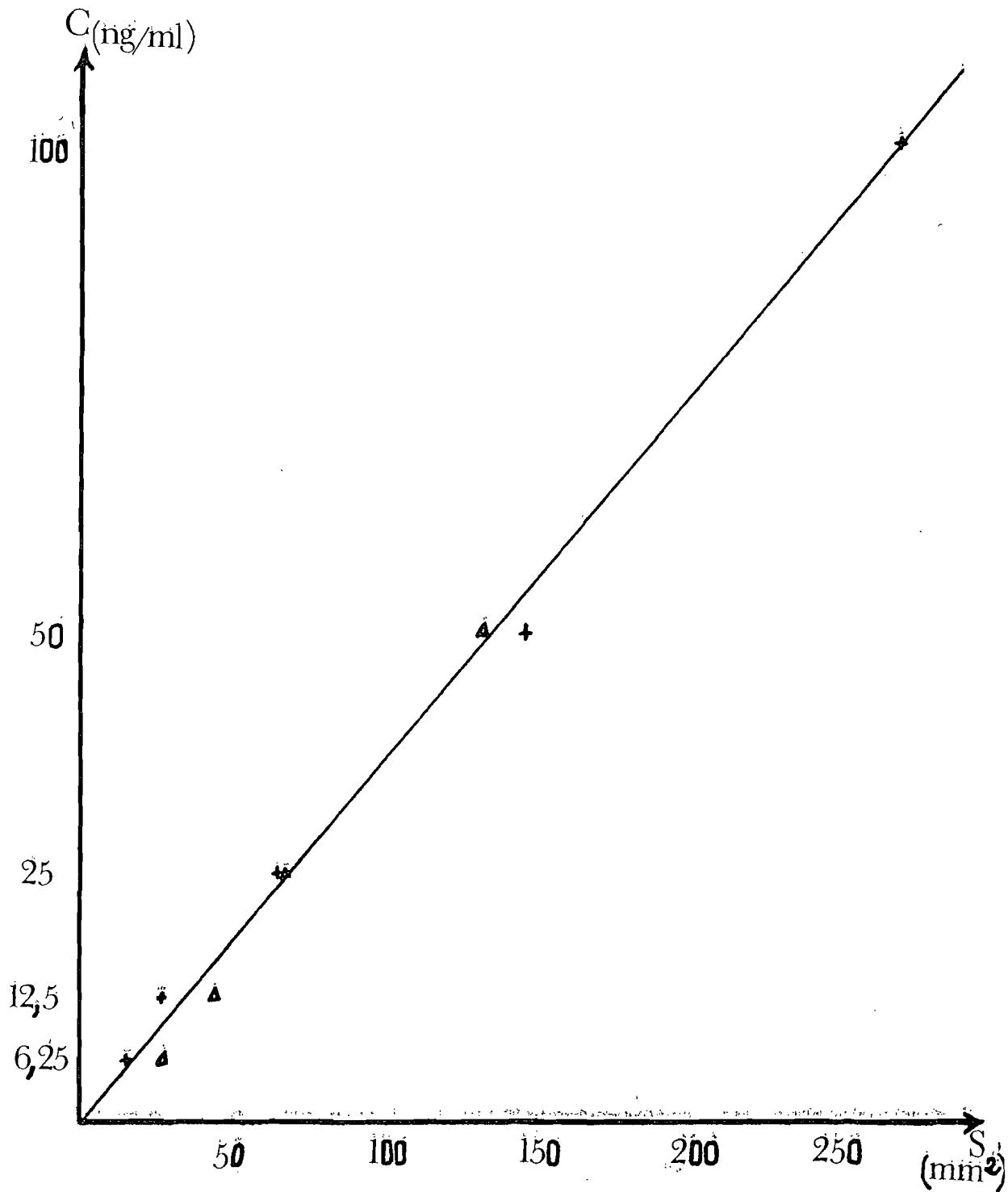
RT	TYPE	AREA	NO CAL	=> AREA %
12.40		14024		80.13

HP 3380B
DLY 4
MV/M 1 00

STOP 30
ATTN 16

REJECT OFF

AFM1 STANDARD 6.25 NG/ML

FIG 22 :

+ : Points obtenus avec les differentes dilutions.

Δ : Points théoriques.

COURBE D'ETALONNAGE

III-3-4-3- Résultats obtenus en utilisant les méthodes d'extraction déjà existantes

Au chapitre III-2-3-1 nous avons essayé différentes méthodes d'extraction ; il ne nous a pas été possible de raccourcir les étapes des opérations à cause des émulsions provoquées. Seule l'application intégrale de la procédure des auteurs, a permis un lavage à l'hexane sans risque d'émulsion, favorisant ainsi l'extraction théorique de l'aflatoxine M1. Les extraits obtenus n'ont pas été purifiés sur colonne chromatographique ni sur cartouche de purification. En conséquence, nous avons observé que l'injection de ces extraits en HPLC avec un solvant d'éluion constitué d'acétonitrile à 25 % dans l'eau, ne permettait pas la séparation des pics.

L'utilisation du nouveau solvant (acétonitrile-méthanol-eau :20-5-75) ne permet pas non plus la séparation des pics. De plus, la colonne est difficile à désaturer, cf.fig 23

La purification de l'extrait sur colonne chromatographique est donc indispensable dans ce cas précis : ce qui explique encore une fois l'insuffisance de la précipitation des protéines du lait. Il faut cependant rappeler que malgré la purification sur cartouche, B. D'ARGENTRE a dû modifier le solvant de WINTERLIN pour parvenir à la séparation du pic d'AFM1. Les chromatogrammes obtenus par les auteurs eux-mêmes (WINTERLIN et FREMY) ne sont pas très différents de ceux que nous obtenons en utilisant notre méthode d'extraction-purification. Cette ressemblance se situe au niveau des pics d'impuretés, or, ces derniers ont bien utilisé des cartouches de purification. cf.fig 24 et 25

III-3-4-4- Résultats obtenus avec la présente méthode

Les conditions suivantes étant réunies : nouvelle méthode d'extraction-purification, solvant nouveau (chapitres III-2-4 et III-3-3), nous avons opéré sur du lait liquide du commerce (Score U.H.T.) contaminé artificiellement par différents taux d'AFM1. Les essais préliminaires n'ont pas révélé la présence d'AFM1 avant cette contamination. La décongélation des laits s'est effectué lentement pour des raisons que nous évoquerons ultérieurement.

Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau suivant:

Echantillons contaminés artificiellement	Numero d'essai	taux retrouvé ng/l	rende- ment %	rendement moyen % (Ecart type cal- culé en utilisant N-1).
10 ng/l (10 ppt)	1	9,25	93	89,8 ± 10,2
	2	10,18	102	
	3	8,79	88	
	4	7,4	74	
	5	9,17	92	
25 ng/l (25 ppt)	1	21,39	85	84,4 ± 0,5
	2	21,22	85	
	3	20,9	84	
	4	21	84	
	5	21	84	
50 ng/l (50 ppt)	1	38,66	77	80,2 ± 2,8
	2	39	78	
	3	40	80	
	4	41,6	83	
	5	41,5	83	
100 ng/l (100 ppt)	1	81,5	82	83 ± 3,4
	2	89	89	
	3	80,9	81	
	4	81,25	81	
	5	82	82	

Les tracés correspondants y compris celui du lait témoin sont indiqués sur les figures 26 à 28.

Observations:

On constate une sensibilité et une bonne reproductibilité de la méthode. À 10 ppt, le pic d'AFM1 devient difficilement détectable. Cette valeur

peut alors être considérée comme la limite de détection de la méthode. En effet la hauteur du pic est égale à environ 5 fois la ligne de base. Cette limite est la plus faible valeur obtenue en HPLC à notre connaissance.

III-3-4-5- Application de la nouvelle méthode d'extraction à l'analyse de laits et produits laitiers provenant d'un centre laitier lyonnais

III-3-4-5-1- Laits liquides

Dès réception, ils ont été congelés. La décongélation s'est ensuite effectuée lentement. Lors de cette analyse nous utilisons encore l'ancien solvant d'éluion HPLC (acétonitrile à 25 % dans l'eau) avec toutes les difficultés que cela comporte. Les résultats obtenus sont les suivants :

Numero de l'échantillon	Teneur en AFM1 (ng/l lait)	Numero de l'échantillon	Teneur en AFM1 (ng/l lait)
1	64,68 *	21	—
2	8,5	22	—
3	—	23	67,61 *
4	56,16 *	24	12,5
5	38	25	46,4
6	9	26	—
7	22,62	27	—
8	198,68 *	28	—
9	—	29	11,85
10	18,5	30	—
11	—	31	10,66
12	—	32	14,81
13	—	33	—
14	17,54	34	traces
15	8,77	35	22,72
16	—		
17	—		
18	—		
19	—		
20	—		

* : Taux > 50 ng/l

Observations :

Près de 11 % des laits reçus contiennent un taux d'AFM1 dépassant le seuil toléré en Suisse, d'où des difficultés éventuelles dans les échanges commerciaux .

III-3-4-5-2- Fromage bleu

Nous avons rencontré de réelles difficultés lors de l'analyse, le solvant utilisé ne permettant pas la séparation du pic d'aflatoxine M1 (acétonitrile 25 % dans l'eau). Ainsi les résultats obtenus au début nous semblaient douteux. Mais grâce à l'utilisation du nouveau solvant, nous avons pu, avec le fromage bleu conservé une semaine au réfrigérateur, obtenir les résultats suivants :

numéro	teneur AFM1 µg/kg
1	0,9
2	0,65

Ces teneurs dépassent le seuil d'AFM1 toléré en Suisse. Type de tracé cf. fig.29

III-3-4-6- Lait en poudre

Comme il a été indiqué au chapitre III-2-4-1-6, cette méthode est applicable au lait en poudre. Nous n'avons pu cependant réaliser des analyses en série à cause de la difficulté de la contamination (homogénéisation difficile à réaliser par rapport au lait liquide). Nous ne pouvons alors qu'indiquer le type de tracé avec le lait en poudre. Fig.30.

FIG 23 :

HPLC:

Lichrosorb RP I8; 5 μ m

Acetonitrile-methanol-eau

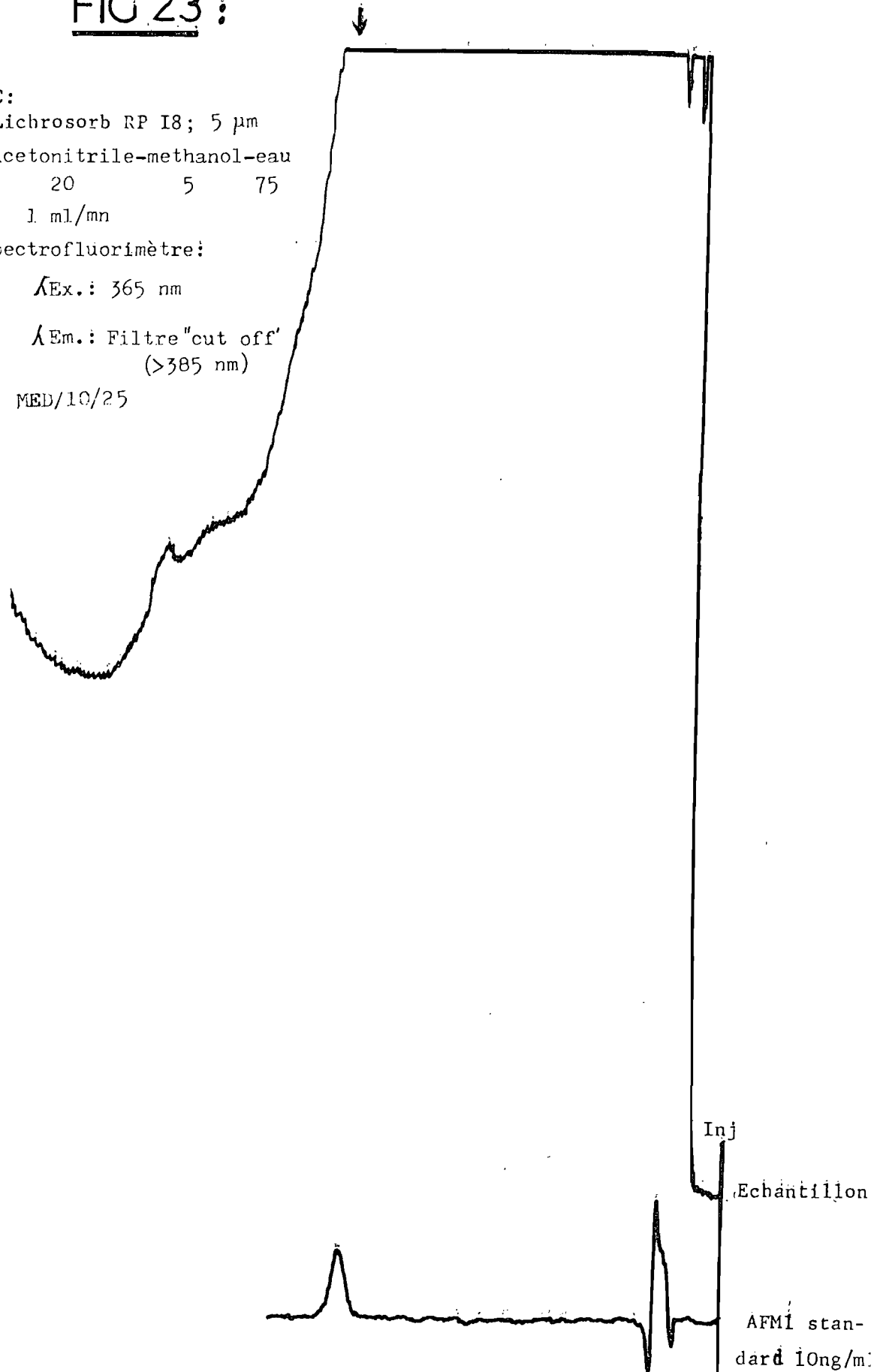
20 5 75

1 ml/mn

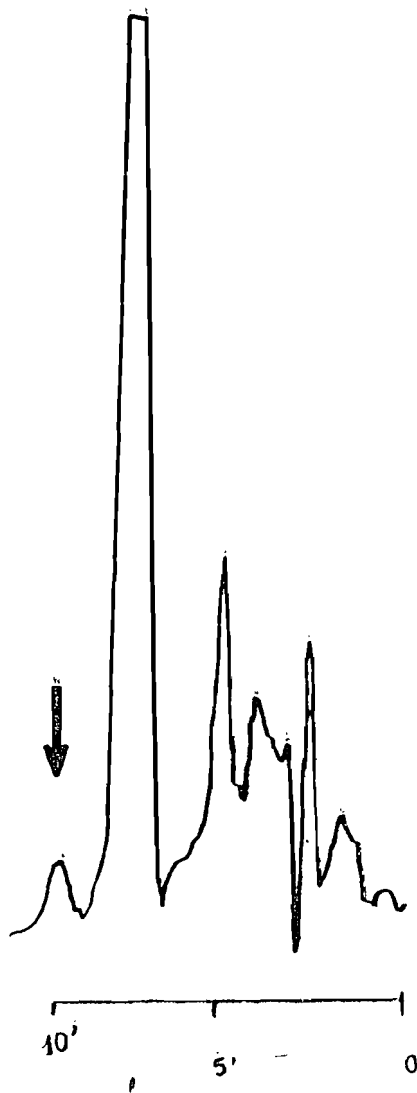
Spectrofluorimètre:

 λ Ex.: 365 nm λ Em.: Filtre "cut off"
(>385 nm)

MED/10/25



EXTRACTION SELON LES METHODES DEJA
EXISTANTES SANS PURIFICATION SUR COLONNE

FIG 24 :

HPLC:

Lichrosorb RP 18; 10 μ m

Acetonitrile-eau (28-72)

2 ml/mn

Spectrofluorimètre :

(Schoeffel)

 λ Ex.: 360 nm λ Em.: Filtre "cut off"
(> 389 nm)

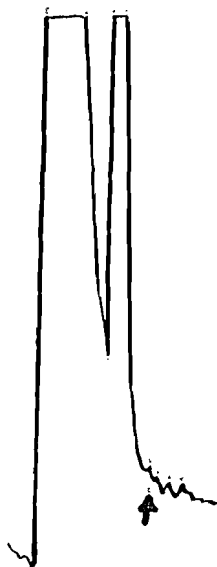
Lait en poudre supplémenté en AFM1 0,1 ppb

CHROMATOGRAMME OBTENU PAR FREMY

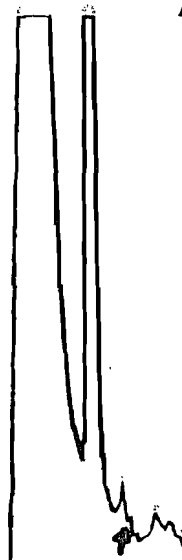
(extrait de la publication originale)(25)

FIG 25

HPLC:

 μ Bondapak C₁₈ + pre-
colonne 30/40 μ VydacAcetonitrile-eau(28-72
2,5 ml/minSpectrofluorimètre:
(Model 420 Waters) λ Ex.: 365 nm λ Em.: environ
400 nm

0 2 4 6

Lait liquide ne contenant pas
d'AFM1

0 2 4 6

Lait liquide contenant 0,1 PPT
AFM1CHROMATOGRAMMES OBTENUS PARWINTERLIN (extrait de la publication originale) (62)

HPLC:

Lichrosorb RP 18; 5 μ m

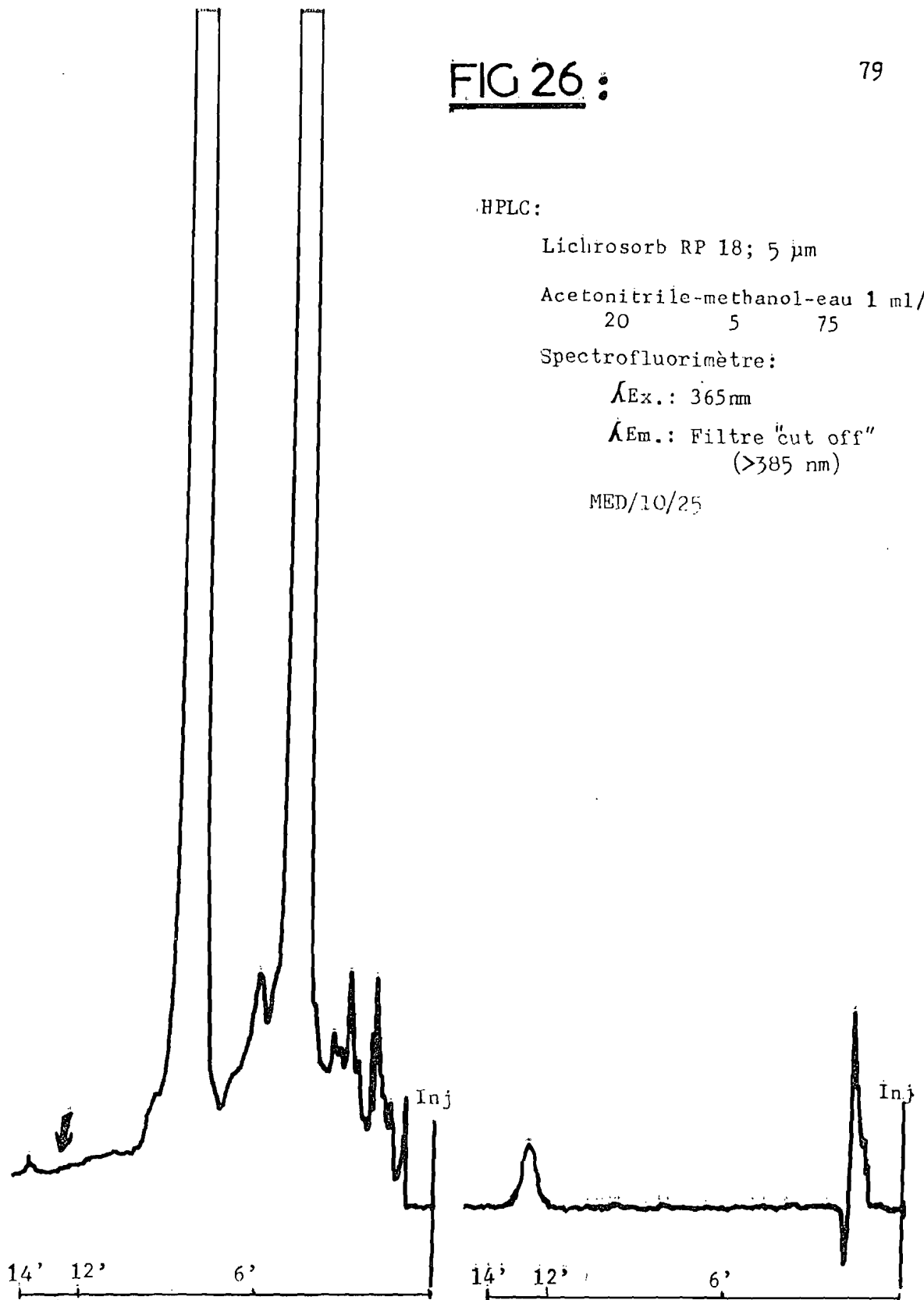
Acetonitrile-methanol-eau 1 ml/l
20 5 75

Spectrofluorimètre:

$\lambda_{Ex.}$: 365nm

$\lambda_{Em.}$: Filtre "cut off"
(>385 nm)

MED/10/25



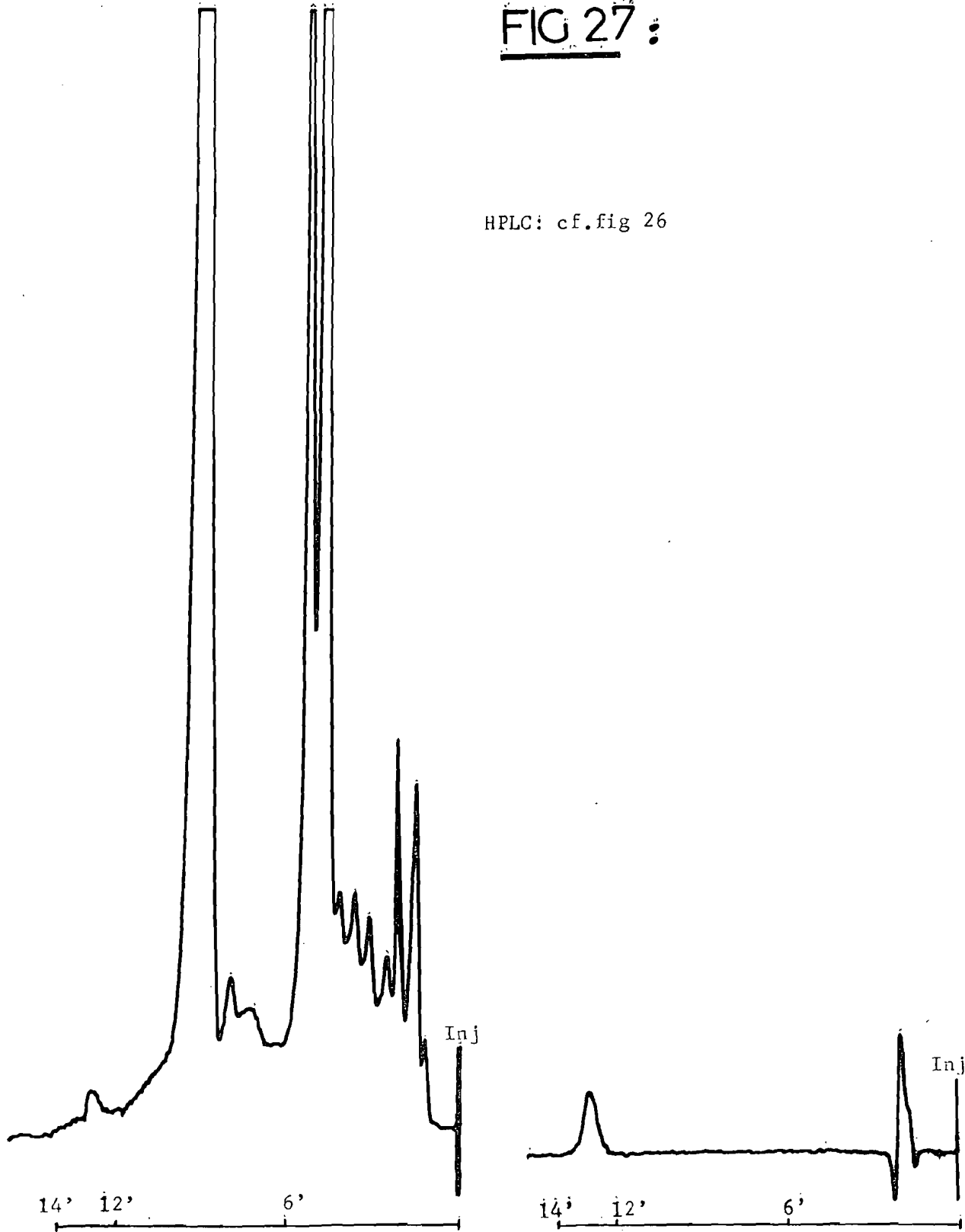
Echantillon témoin

AFMI standard 10 ng/ml

LAIT LIQUIDE TEMOIN

FIG 27 :

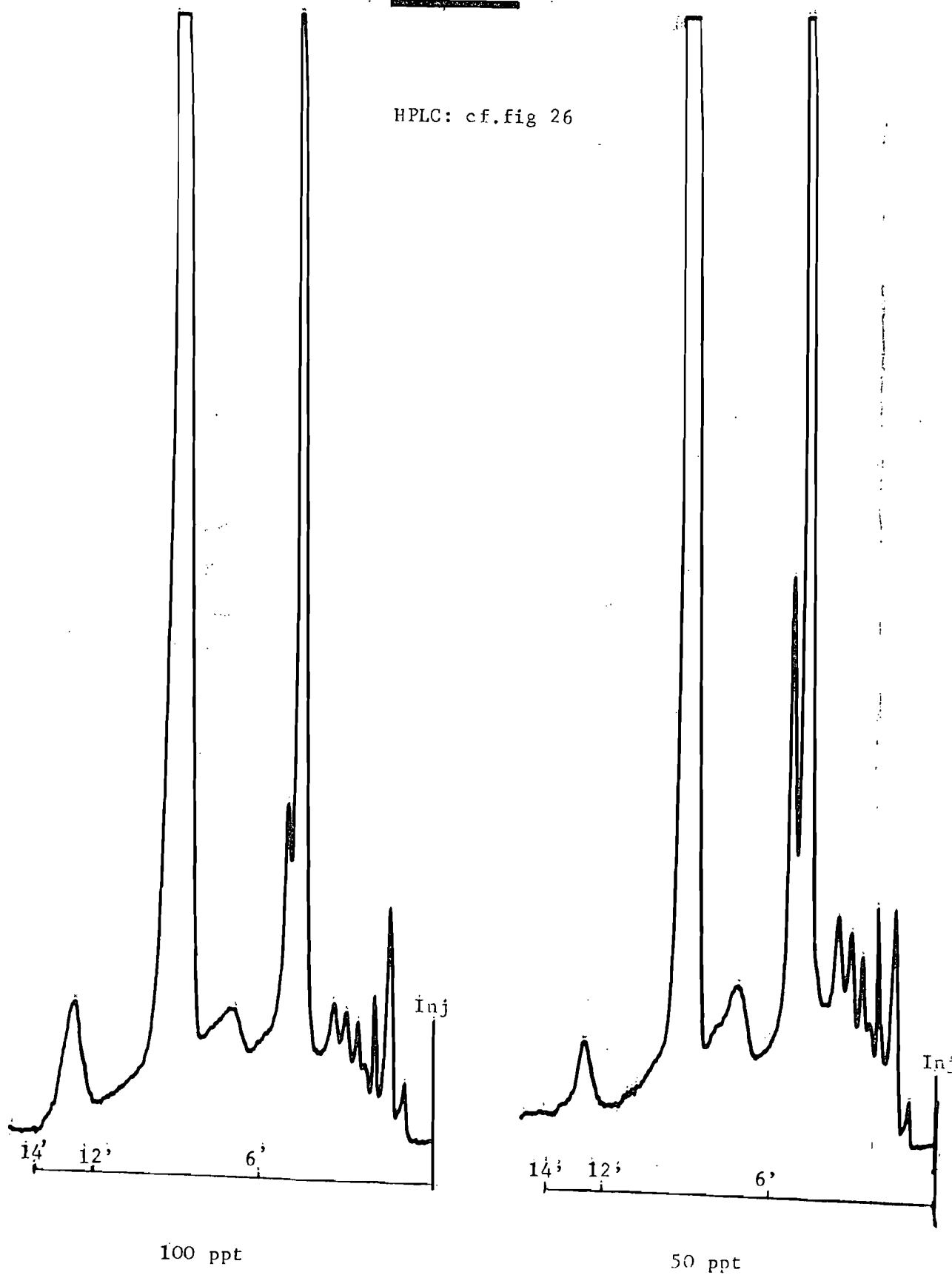
HPLC: cf. fig 26



AFM1 standard 10 ng/ml

LAIT LIQUIDE CONTENANT 10 PPT AFM1

HPLC: cf. fig 26



LAITS LIQUIDES CONTENANT 50 ET 100 PPT AFM

FIG 29 :

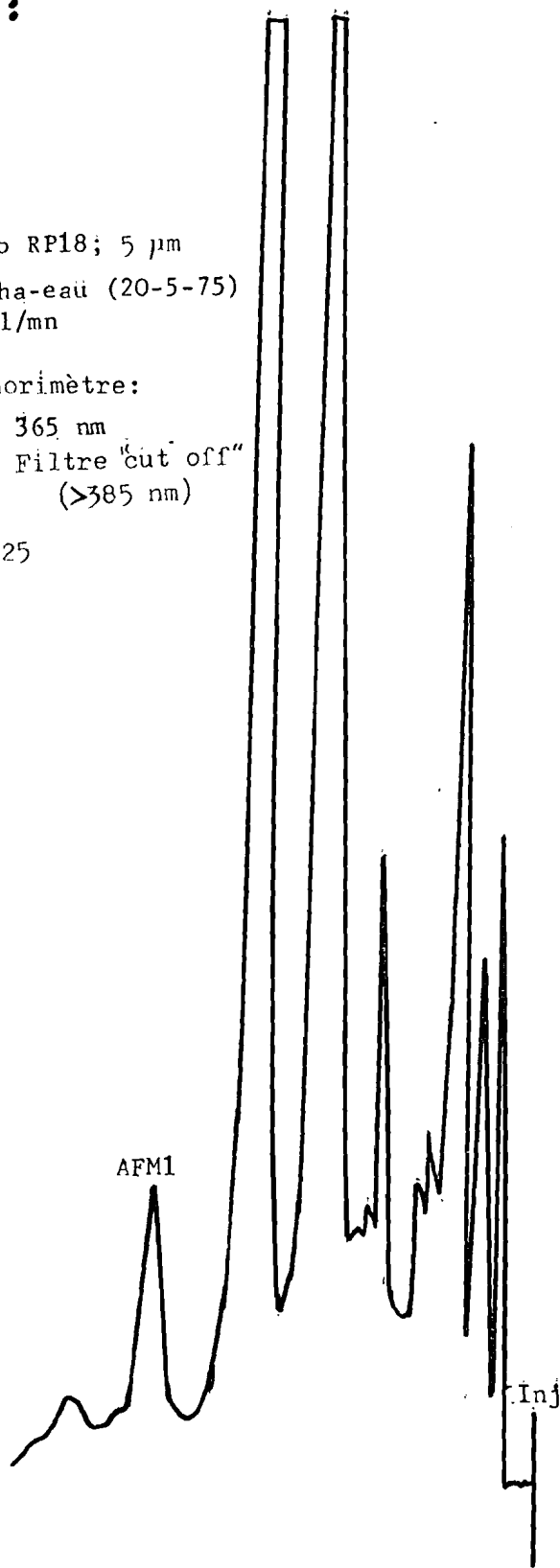
HPLC:

Lichrosorb RP18; 5 μ mAceto-metha-eau (20-5-75)
1,1ml/mn

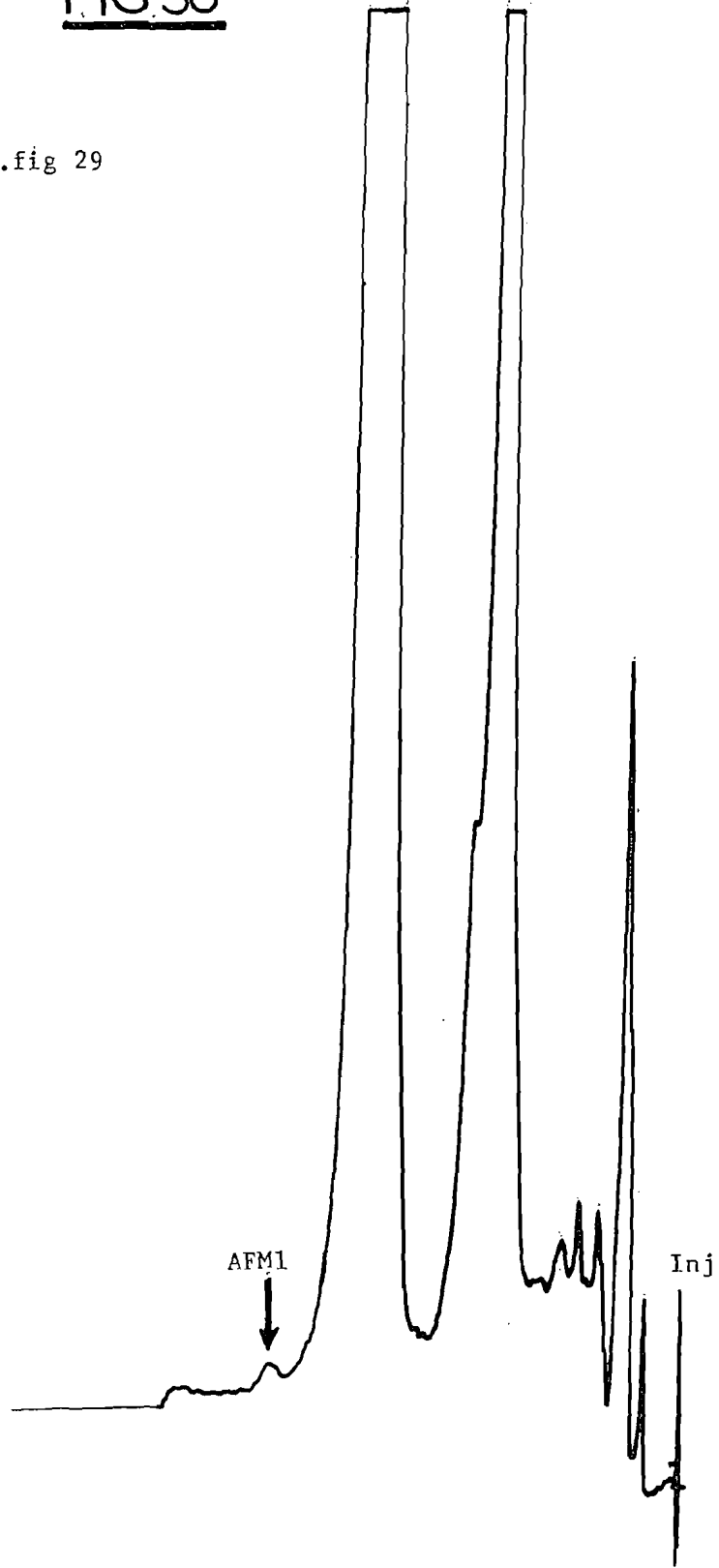
Spectrofluorimètre:

 λ Ex.: 365 nm λ Em.: Filtre "cut off"
(>385 nm)

MIBD/10/25

FROMAGE CONTENANT 0,79 PPB AFM₁

HPLC: cf.fig 29



LAIT EN POUDRE (QUICK LAIT) SUPPLEMENT
EN AFM₁ 10 PPT.

III-3-5- Influence de la congélation et décongélation sur l'AFM1

III-3-5-1- Influence de la décongélation sur le rendement de l'extraction

Nous avons constaté au cours de ce travail, que le système de décongélation du lait modifie le rendement de l'extraction.

Deux laits artificiellement contaminés ont été décongelés entièrement au bain-marie bouillant. Les résultats obtenus après extraction sont indiqués sur les tableaux ci-dessous :

Echantillons (AFM1 ng/l lait)	Numero d'essai	Rendement en %	Rendement moyen en % (*)
50 ng (50 ppt)	1	71	67,4 ± 2,6
	2	68	
	3	68	
	4	66	
	5	64	
100 ng (100 ppt)	1	73	70,7 ± 2,6
	2	68	
	3	73	
	4	—	
	5	69	

* : Ecart type calculé en utilisant N-1.

Observations :

Ce type de décongélation provoque un abaissement d'environ 12 % du rendement obtenu après une décongélation douce: c'est à dire une décongélation à moitié au bain-marie bouillant et poursuite à la température ambiante, ou bien une décongélation lente à 5° C (réfrigérateur) mais cela nécessite plusieurs heures d'attente.

IL EST INDISPENSABLE DE TENIR COMPTE DE CE SYSTÈME DE DÉCONGÉLATION POUR ÉVITER TOUT RISQUE DE RÉSULTATS FAUSSEMENT NÉGATIFS QUI SERAIENT FACHEUX LORS D'UNE EXPERTISE TOXICOLOGIQUE.

III-3-5-2-Influence de la congélation sur la stabilité de l'AFM1

Plusieurs données bibliographiques indiquent une diminution de la teneur en AFM1 lors de la consommation du lait à - 18 ° C. Cette diminution débiterait à partir du 68 eme jour. Au cours de notre étude, nous avons tenté de vérifier cette hypothèse en opérant sur des laits artificiellement et naturellement contaminés:

III-3-5-2-1- Laits artificiellement contaminés

Deux laits contaminés chacun à 50 et 100 ng/l le 25/03/82 ont été dosés selon le calendrier indiqué au tableau 8.

Les résultats obtenus montrent une stabilité de l'AFM1 après un mois de conservation suivie d'une diminution de cette teneur d'environ 13% au bout de 90 jours. Il nous est cependant impossible de préciser le début de cette dégradation. Nous pouvons par contre, rapprocher ce résultat de la théorie de STUBBLEFIELD selon laquelle une solution chloroformique d'AFM1 ne peut se conserver au delà de 3 mois (57)

III-3-5-2-2- Laits naturellement contaminés

Lors de l'analyse de laits liquides reçus d'un centre laitier lyonnais, nous avons effectué des essais en double pour les échantillons n° 4 et 8 qui ont été conservés par la suite à - 18° C.

Lorsque nous avons observé la stabilité de l'AFM1 standard dans le lait après un mois de conservation, il nous a semblé logique de vérifier l'état de la toxine dans ces échantillons n° 4 et 8. Nous n'avons pu malheureusement avoir les résultats de l'échantillon n° 8 à cause d'une erreur survenue lors du dosage. Les résultats obtenus après analyse de l'échantillon n° 4 sont rassemblés dans le tableau suivant :

Date de l'analyse	Numero d'essai	Taux obtenu ng/l (80 % de rendement)	moyenne (*)
28/01/82	1	44,9	47,1 ± 3,1
	2	49,3	
02/06/82	1	46,5	48,5 ± 3,3
	2	51,5	
	3	52,5	
	4	46,8	
	5	45	

* : Ecart type calculé en utilisant N-1.

Observations :

Contrairement à la contamination artificielle, nous observons ici, une stabilité indiscutable de l'AFM1, bien que la première analyse ne soit pas statistiquement interprétable (petit nombre d'essais).

Ces résultats sont en contradiction avec ceux de la littérature mais il est possible que cela soit dû au manque de précision des méthodes CCM utilisées par ces auteurs.

Cette observation est d'autant plus intéressante que les échantillons de lait sont obligatoirement congelés avant d'être analysés, à cause de la longueur des opérations.

TABLEAU 8

Date d'analyse	Echantillon	Numero d'essai	Taux retrouvé ng/l	moyenne (*)
30/03/82	50 ng/l (50 ppt) A	1	38,6	40,1 ± 1,4
		2	39	
		3	40	
		4	41,6	
		5	41,5	
	100 ng/l (100 ppt) B	1	81,5	82,9 ± 3,4
		2	89	
		3	80,9	
		4	81,2	
		5	82	
04/05/82	A	1'	39,3	40,1 ± 1,2
		2'	40	
		3'	39,6	
		4'	42,1	
		5'	39,4	
	B	1'	80,4	81,3 ± 3,2
		2'	83,3	
		3'	78,5	
		4'	85,7	
		5'	78,5	
28/06/82	A	1''	35,7	34,1 ± 1,4
		2''	32,7	
		3''	33,3	
		4''	35,7	
		5''	33,3	
	B	1''	61,6	62 ± 3,2
		2''	57,6	
		3''	64,1	
		4''	64,6	
		5''	—	

* : Ecart type calculé en utilisant N-1.

STABILITE DE LAFM₁ DANS LAITS
ARTIFICIELLEMENT CONTAMINES

IV- DISCUSSION ET CRITIQUE DE LA METHODE

les techniques HPLC permettent d'éviter les contraintes de la chromatographie couche mince (délicatesse du dépôt et de la révélation, nécessité d'un densitomètre pour les faibles quantités d'aflatoxine M1).

La particularité de la présente méthode repose sur deux points essentiels :

1°) L'efficacité de la technique de précipitation des protéines du lait.

Elle permet ainsi l'omission de la phase de purification sur colonne chromatographique contrairement aux méthodes déjà existantes. L'extraction de l'AFM1 se réalise avec un seul solvant (CHCl_3) ; ceci est excellent car cette toxine est présente en très faible quantité dans le lait. Un gain considérable est alors réalisé en temps et en coût (réduction de la quantité de solvants et de matériel).

2°) L'amélioration de la séparation du pic d'AFM1 que nous n'avons point observé avec les solvants d'éluion déjà existants.

Bien qu'utilisant des cartouches de purification, les chromatogrammes obtenus par FREMY et WINTERLIN sont comparables aux nôtres. La colonne est réutilisable même après une cinquantaine de dosages, au lieu d'une vingtaine avec les autres techniques.

Cette méthode se caractérise aussi par sa simplicité, sa rapidité et sa sensibilité.

C'est une méthode économique et polyvalente (adaptable à tous les produits laitiers).

A côté de ces avantages non négligeables, il existe un nombre important de contraintes ou d'inconvénients :

- il faut manipuler avec soin lors de la filtration du précipité, de façon à obtenir un filtrat clair et limpide indispensable pour éviter tout risque d'émulsion.

- le manipulateur doit utiliser le même matériel depuis le filtrat jusqu'à l'extrait chloroformique (erlen, ampoule à décanter, agitateur). Il doit opérer sous la hotte pour éviter l'inhalation des solvants

(hexane, chloroforme) de même qu'il doit manipuler avec soin la solution standard d'AFM1.

- la fin de la concentration de l'extrait doit être surveillée afin d'éviter une évaporation à sec.

- il faut éviter la présence de bulles d'air dans la colonne par un dégazage préalable du solvant d'éluion mais aussi par éviction du pompage d'air en surveillant le niveau du solvant dans le flacon.

- il faut aussi éviter l'aspiration d'air dans la boucle d'injection.

- comme les autres techniques, la colonne a besoin d'être nettoyée mais, cette fois, tous les 5 à 6 dosages au lieu de 2.

- le manque de spécificité du filtre "cut off" pose un problème certain à cause de la complexité de la composition du lait. On peut alors craindre des résultats faussement positifs. Mais, on peut y remédier par addition d'AFM1 standard à l'échantillon. On notera alors, soit une augmentation du pic de départ, ce qui équivaldrait à une confirmation, soit une persistance ou diminution du pic, donc résultat négatif. Dans les deux cas, le raisonnement tiendra compte du facteur de dilution.

- La technique de décongélation doit aussi être prise en compte si l'on veut éviter des résultats faussement positifs.

- le coût de l'appareil HPLC sera compensé par sa polyvalence.

CONCLUSION

Les aflatoxines en général, et l'aflatoxine M1 en particulier, constituent une menace pour la santé humaine, surtout dans les pays du tiers-monde où les conditions climatiques favorisent leur développement. Les risques y sont d'autant plus élevés que l'alimentation n'est pas contrôlée. Il est donc judicieux et louable d'utiliser tous les moyens épidémiologiques pour diminuer les risques de contamination directes ou indirectes :

- Risques de contamination directe :

Ils peuvent être atténués grâce à la surveillance des récoltes.

- Risques de contamination indirecte :

Ils concernent plus particulièrement le lait et les produits laitiers.

A notre connaissance, il est pratiquement impossible de décontaminer un lait sans lui ôter sa valeur nutritive. C'est pourquoi les moyens de lutte contre la contamination doivent s'effectuer d'une part au niveau des aliments du bétail laitier, d'autre part, au niveau du lait avant sa consommation ou sa distribution. Cette dernière recommandation nécessite une technique d'analyse simple, rapide, peu onéreuse, fiable et sensible. Les méthodes HPLC semblent répondre à ces critères, du moins en ce qui concerne celle que nous proposons :

- Grâce à l'utilisation d'un agent précipitant très efficace, il n'a pas été nécessaire de purifier l'extrait sur colonne chromatographique, si bien qu'un seul solvant a suffi pour extraire l'AFM1, ce qui est remarquable.

- La grande innovation apportée par cette méthode par rapport aux techniques existantes, se situe au niveau de l'efficacité de la précipitation des protéines du lait et de la bonne séparation du pic d'AFM1.

- La limite de détection observée (10 ppt) est d'autant plus intéressante qu'il est possible de l'abaisser plus encore par l'utilisation d'une cuve remplie de silice (elle augmenterait la sensibilité) (10, 63, 64).

Comparativement à toute technique d'analyse, la présente méthode n'est pas dénuée d'inconvénients qui nous paraissent mineurs à côté des avantages.

Perspectives d'avenir sur le plan analytique :

Avec le progrès technologique, on peut imaginer des modifications ou améliorations considérables dans le dosage de l'AFM1 en HPLC. Déjà, l'utilisation d'un programmateur permet un mélange instantané des solvants d'élution (cas de plus d'un solvant). Elle pourrait être étendue à la sélection de la sortie des pics voire l'alternance du solvant de dosage avec celui du nettoyage de la colonne, ce qui serait intéressant pour un échantillon aussi complexe que le lait.

Si la cuve remplie de silice peut déjà améliorer la limite de détection, il ne serait pas illusoire de penser que l'utilisation du rayonnement Laser pourrait encore abaisser cette limite de détection, rendant ainsi possible la détection de l'AFM1 sous forme de traces.

L'AMELIORATION TECHNIQUE DE CE DOSAGE EN HPLC PERMET UNE DETECTION PLUS PRECISE EN MEME TEMPS QU'UNE SIMPLIFICATION DE LA PHASE D'EXTRACTION-PURIFICATION. CECI ENTRAINERA UNE PREVENTION PLUS EFFICACE DES CONTAMINATIONS ET PAR CONSEQUENT, CONTRIBUERA A MIEUX GARANTIR L'ALIMENTATION HUMAINE ET ANIMALE.

BIBLIOGRAPHIE

- 1- ALLCROFT R., CARNAGHAN R.B.A.
Groundnut toxicity : an examination for toxin in human food products from animal fed toxic groundnut meal.
Vet. Rec. 1963, 75 (10), 259-263.
- 2- ALLCROFT R., ROBERTS B.A.
Toxic groundnut meal : the relationship between aflatoxin B1 intake by cows and excretion of aflatoxin M1 in milk.
Vet. Rec. 1968, 82, 116-118.
- 3- ALLCROFT R., ROBERTS B.A., LLOYD M.K.
Excretion of aflatoxin in lactating cow.
Food Cosmet. Toxicol. 1968, 6, 619-625.
- 4- ANONYME
Aflatoxin M1
In: Official méthodes of analysis
Ass. Off. Anal. Chem.
Editor W. HORWITZ, 12th edition, 1975, 475-476.
- 5- ANONYME
Aflatoxin M1
In: Official méthodes of analysis
Ass. Off. Anal. Chem.
Editor W. HORWITZ, 13th edition, 1980, 427-429.
- 6- ANONYME
Processus de fabrication-note technique Produits.
France Lait. 1982.
- 7- ASSAO T., BUCHI G., ABDEL KADER M.M., CHANG S.B., WICK E.L., WOGAN G.N.
Aflatoxins B and G.
J. Amer. Chem. Soc. 1963, 85, 1706-1707.
- 8- AUSTWICK P.K.C.
Mycotoxins
Br. Med. Bull. 1975, 31 (3), 222-229.

- 9- BERBE R.N., TAKAHASHI D.M.
Determination of aflatoxin M1 by high pressure liquid chromatography using fluorescence detection.
J. Agric. Food Chem. 1980, 28 (2), 481-482.
- 10- BLANC M.
Méthode rapide de dosage de l'aflatoxine M1 dans les produits laitiers.
Ind. Aliment. Agric. 1980, 9, 894-901.
- 11- BONNET O., VEIL S.
Aliments diététiques et de régime de l'enfance.
J.O. 13-14 Sept. 1976, 5519-5522.
- 12- BUCHI G., WEINREB S.M.
The total synthesis of racemic aflatoxin M1 (milk toxin).
J. Amer. Chem. Soc. 1969, 91, 5408-5409.
- 13- CAMPBELL T.C., CAEDO J.P. , BULATAO-JAYME J., SALAMAT L. , ENGEL R.W.
Aflatoxin M1 in human urin.
Nature. 1970, 127, 403-404.
- 14- CAMPBELL T.C., HAYES J.R.
The role of aflatoxin metabolism in its lesion.
Toxicol. Appl. Pharmacol. 1976, 35, 199-222.
- 15- CANTON J.H., VANLOGTEN M.J., VAN SCHOTHORST M., STVENUITER J.F.C., VERHULSDOUK C.A.H.
The carcinogenicity of aflatoxin M in rainbow trout.
Food Cosmet. Toxicol. 1975, 13 (4), 441-443.
- 16- CARNAGHAN R.B.A., HARTLEY R.D., O'KELLY J.
Toxicity and fluorescence properties of the aflatoxins.
Nature. 1963, 200, 1101.

17- CARNAGHAN R.B.A.

Hepatic tumours and other chronic liver changes in rats following a single oral administration of aflatoxin.

Br. J. Canc. 1967, 21, 811-814.

18- CARREZ J.F.

Emploi de lactoserum hydrolysé dans certaines denrées alimentaires.

J.O. 16 Fev. 1980, NC 1764-1765.

19- CHANG S.B., ABDEL-KADER M.M., WICK E.L., WOGAN G.N.

Aflatoxin B2 : chemical identity and biological activity.

Science. 1963, 142, 1191-1192.

20- COKER R.D.

Aflatoxin : past, present and future.

Trop. Sci. 1979, 21, (3), 143-162.

21- D'ARGENTRE B.

Stage de fin d'année.

I.U.T. Biologie, Lyon, 1981.

22- DE IONGH H., VLES R.O., VAN PELT J.G.

Milk of mammals fed and aflatoxin-containing diet.

Nature. 1964, 202, 466-467.

23- DI PAOLO J.A., ELIS J., ERWIN H.

Teratogenic response by hamsters, rats and mice to aflatoxin B1.

Nature. 1967, 215, 638-639.

24- FREMY J.M.

Aflatoxine M1 et technologie laitière : analyse et évolution de la contamination dans le lait et ses dérivés.

Thèse 3ème cycle Nutrition. Paris VI, 1980.

- 25- FREMY J.M.; CARIOU T.; TERRIER C.
Evaluation de la contamination en aflatoxine M1 dans le lait en poudre par HPLC en phase inverse.
Ann. Fais. Exp. Chim:1981; 74 (801); 547-554.
- 26- FUKAYAMA M.; WINTERLIN W.; HSIEH D.P.H.
Rapid method for analysis of aflatoxin M1 in dairy products.
J. Assoc. Off. Anal. Chem: 1980, 63 (4); 927-930.
- 27- GAUCH R.; LEUENBERGER U.; BAUMGARTNER E.
Rapid and simple determination of aflatoxin M1: The low parts per 10^{12} range.
J. Chromatogr. 1979; 178; 543-549.
- 28- GREGORY J.F.; MANLEY D.
High-performance liquid chromatographic determination of aflatoxins in animals tissues and products.
J. Ass. Off. Anal. Chem: 1981, 64 (1); 144-151.
- 29- HARTLEY R.D.; NESBITT B.F.; O'KELLY J.
Toxic metabolites of Aspergillus flavus.
Nature. 1963, 198; 1056-1058.
- 30- HOLADAY C.E.
Rapid screening method for aflatoxin M1 in milk:
J. Ass. Off. Anal. Chem: 1981, 64 (5); 1064-1066.
- 31- HOLZAPFEL C.W., STEYN P.S., PURCHASE I.F.H.
Isolation and structure of aflatoxins M1 and M2:
Tetrahedron Lett: 1966, 25; 2799-2803.
- 32- KIERMEIER F.; MASHALEY R.
Einfluss der Molkereitechnischen Behandlung der Rohmilch auf den Aflatoxin M1 Gehalt der daraus hergestellten Produkte.
Z. Lebensmittel Untersuch. Forsch. 1977; 164 (3); 183-187.

- 33- LAFONT P.
Elimination de l'aflatoxine par la mamelle chez la vache.
Cah. Nutr. Diet. 1975; 10 (1), 55-57.
- 34- LAFONT P., LAFONT J.
Etude de la contamination du lait de vache lors de l'ingestion
de faibles quantités d'aflatoxines.
Ann. Nutr. Alim : 1980; 34; 699-708.
- 35- LAFONT P., SIRIWARDANA M., JACQUET J., GAILLARDIN M., SARFATI J.
Méthode de dosage de l'aflatoxine M dans le lait et les produits
laitiers.
Le Lait. 1981; 61; 275-281.
- 36- LANCASTER M.C., JENKINS F.P., PHILIPP J. McL.
Toxicity associated with certain samples of groundnuts.
Nature. 1961, 192, 1095-1096.
- 37- LECOQ R.
Tonogramme : urée, glycémie.
In : Manuel d'analyses médicales et de biologie clinique.
Doin. 3ème édition. 1972, II, 1545.
- 38- LEHNINGER A.L.
Protéines: purification et caractérisation.
In: Biochimie: bases moléculaires de la structure et des fonctions
cellulaires.
Flammarion, 2^e édition; 1977, pp. 153-178.
- 39- MASRI M.S.; LUNDIN R.E., PAGE J.R., GARCIA V.C.
Crystalline aflatoxin M1 from urin and milk.
Nature. 1967; 215; 753-755.
- 40- MASRI M.S.; GARCIA V.C., PAGE J.R.
The aflatoxin M content of milk from cows fed amounts of aflatoxin.
Vet. Rec. 1969; 84; 146-147.

- 41- Mc KINNEY J.D.; CAVANAUGH G.C.; BELL J.T.; HOVERSLAND A.S.; NELSON D.M.,
PEARSON J.; SELKIRK R.J.
Effect of ammoniation on aflatoxins in rations fed lactating cows:
J.Amer: Oil Chem. Soc: 1973; 50, 79-94.
- 42- MOULE Y.; CHANY E.; SARASIN A.
Mycotoxines:
Can. Nutr. Diet. 1976; supp. 2; 49-58:
- 43- NABNEY J.; BURBAGE M.B.; ALLCROFT R.; LEWIS G:
Metabolism of aflatoxin in sheep : excretion pattern in the
lactating ewe.
Food Cosmet. Toxicol. 1967; 5, 11-17.
- 44- O.M.S.
Mycotoxines.
Critères d'hygiène de l'environnement: 1980; 11
- 45- ONG T.M.
Aflatoxin mutagenesis:
Mutat. Res. 1975; 32, 55-53.
- 46- PATTERSON D.S.P.; GLANCY E.M.; ROBERTS B.A.
The " carry over " of aflatoxin M1 into the milk of cows fed
rations containing a low concentration of aflatoxin B1.
Food Cosmet. Toxicol. 1980; 18; 35-37:
- 47- POLAN C.E.
Consumption and fate of aflatoxin B1 by lactating cows:
J. Agr. Food Chem. 1974, 22; 635-638.
- 48- POLZHOFFER K.P.
Hitzestabilität von Aflatoxin M1:
Z. Lebensmitt. Untersuch. Forsch: 1977; 164 (2); 80-81:

49- PONS W.A.; CUCULLU A.F.; LOUISE S.L.

Method for the determination of aflatoxin M₁ in fluid milk and milk products:

J. Ass. Off. Anal. Chem. 1973; 56 (6); 1431-1436.

50- PURCHASE I.F.H.

Acute toxicity of aflatoxins M₁ and M₂ in one-day-old ducklings.
Food Cosmet. Toxicol. 1967; 5; 339-342.

51- PURCHASE I.F.H.; STEYN M.; RINSMA R.; TUSTIN R.C.

Reduction of aflatoxin M content of milk by processing:
Food Cosmet. Toxicol. 1972, 10, 383-387.

52- SARGEANT K., SHERIDAN A., O'KELLY J., CARNAGHAN R.B.A.

Toxicity associated with certain samples of groundnuts.
Nature. 1961, 192, 1096-1097.

53- STOLOFF L.; TRUCKESSESS M.; HARDIN N.; FRANCIS O.J.; HAYES J.R.;
POLAN C.E.; CAMPBELL T.C.

Stability of aflatoxin M in milk.
J. Dairy Sci. 1975; 58 (12); 1789-1793.

54- STOLOFF L.

Aflatoxin M in perspective.
J. Food Protect. 1980; 43 (3); 226-230.

55- STUBBLEFIELD R.D.; SHANNON G.M.

Aflatoxin M₁ : analysis in dairy products and distribution in dairy food made from artificially contaminated milk:
J. Ass. Off. Anal. Chem. 1974; 57 (4); 847-851.

56- STUBBLEFIELD R.D.

The rapid determination of aflatoxin M₁ in dairy products.
J. Amer. Oil Chem. Soc. 1979; 56 (9); 800-802.

57- STUBBLEFIELD R.D.

Stability and molar absorptivity of aflatoxin M₁ in acetonitrile-
benzene (1+9).
J. Ass. Off. Anal. Chem. 1980; 63 (3); 634-636.

- 58- TRIPET F.Y.; RIVA C.; VOGEL J.
Contamination du lait et des produits laitiers par l'aflatoxine M₁.
Le Lait. 1981, 61, 634-637.
- 59- TUINSTRÁ L.G.M.; BRONGEEST J.M.
Determination of aflatoxin M₁ in milk at the parts per trillion
level.
J. Chromatogr. 1975; 111, 448-451.
- 60- WOGAN G.N.; PAGLIALUNGA S.
Carcinogenicity of synthetic aflatoxin M₁ in rats.
Food Cosmet. Toxicol. 1974, 12; 381-384.
- 61- WONG J.J.; HSIEH D.P.H.
Mutagenicity of aflatoxins related to their metabolism and carcino-
genic potential.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1976, 73; 2241-2244.
- 62- WINTERLIN W.; GREGORY H.; HSIEH D.P.H.
On-column chromatographic extraction of aflatoxin M₁ from milk
and determination by reversed phase high performance liquid
chromatography.
Anal. Chem. 1979; 51 (11); 1873-1874.
- 63- ZIMMERLI B.
Beitrag zur Bestimmung von Aflatoxinen mittels Hochdruck-flüssig-
keitschromatographie.
Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 1977; 68; 36-45.
- 64- ZIMMERLI B.
Verbesserung der nachweisgrenze von Aflatoxinen in der Hochdruck-
flüssigkeits-chromatographie durch Verwendung eines Kieselgefüllten
Fluoreszenzdetektors.
J. Chromatogr. 1977; 131; 458-463.

