

CHROM. 11,064

Note

Dosage de toxines d'*Aspergillus fumigatus* en chromatographie sur couche mince

J. P. DEBEAUPUIS et P. LAFONT

I.N.S.E.R.M. U.1Bis, Unité de Recherche de Toxicologie Alimentaire, 44, Rue du Chemin de Ronde, B.P. No. 40, 78110 Le Vésinet (France)

(Reçu le 6 mars 1978; manuscrit modifié reçu le 7 avril 1978)

Des substances toxiques de différents types ont été décrites chez *Aspergillus fumigatus*¹⁻³. Récemment, nous avons mis en évidence un nouveau groupe de quatre composés, les fumitoxines A, B, C et D⁴. La structure exacte de ces toxines n'a pas encore été établie mais plusieurs constantes physiques et quelques caractéristiques chimiques sont connues⁵. Les seules possibilités d'évaluation quantitative dans les extraits bruts dont nous disposions étaient des dosages biologiques (arrêt du développement de l'embryon de poulet, inhibition de cultures cellulaires, effet léthal pour *Artemia salina* L.). Mais ces méthodes ne permettent pas de distinguer les toxines les unes des autres.

En utilisant des propriétés d'absorption dans l'ultraviolet (UV) et la possibilité de séparation des fumitoxines par chromatographie sur couche mince (CCM), nous nous sommes attachés à mettre au point une méthode de dosage par photodensitométrie.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Fumitoxines

Les substances cristallisées ont été préparées au laboratoire à partir d'extraits organiques de cultures *in vitro* d'*Aspergillus fumigatus* Fres.⁵.

Chromatographie sur couche mince

Tous les essais ont été effectués sur couches minces de gel de silice de 0.25 mm d'épaisseur (plaques finies Merck, en verre). En chromatographie d'adsorption, les plaques sont préalablement activées à 110° durant 40 min. En chromatographie de partage, l'eau étant la phase stationnaire, elles sont hydratées avant l'emploi. Les fumitoxines sont déposées en solution chloroformique sous volume de 2 µl. Après le développement, les plaques sont séchées sous courant d'azote. Les composés absorbant dans l'UV sont repérés en plaçant sous le chromatogramme une couche mince de cellulose qui, en "brillant" sous UV de grande longueur d'onde (lampe Philips HPW 125) fait apparaître les substances absorbantes sous la forme de taches sombres, sur fond blanc-bleu.

Spectrophotométrie

Les spectres d'absorption dans l'UV des fumitoxines cristallisées sont effectués en solution éthanolique (20 µg/ml), dans des cuves en quartz, sur un spectrophotomètre D. B. Beckman. Les mesures photodensitométriques sont réalisées par transparence sur un photomètre-intégrateur Vernon PHI-5 (Vernon, Paris, France) équipé d'un bloc d'alimentation et d'une lampe-source "Mercure" haute pression en utilisant la bande d'émission à 365 nm. Les lectures sont effectuées en utilisant l'étalon interne de densité de l'appareil pour 0.2 ou 1 de densité optique à pleine échelle.

Essais sur extraits de produit végétal

Pour simuler un dosage à partir d'extraits de produits naturels contaminés, 50 g de drêche de betterave sont soumis à une extraction chloroformique (63°, 2 × 1 h, 4.5 ml de chloroforme par gramme de drêche sèche). Après élimination des lipides par l'hexane et concentration, l'extrait est additionné d'une solution chloroformique de fumitoxine A (concentrations allant de 1 · 10⁻⁵ à 1 · 10⁻⁷).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

En CCM, la séparation des quatre fumitoxines par adsorption est très délicate et peu reproductible. Elle est plus aisée et plus constante en chromatographie de partage (Tableau I). Les phases acides accélèrent la migration mais donnent des séparations médiocres. Les phases basiques détruisent totalement les toxines étudiées. L'utilisation de l'eau comme phase stationnaire permet une bonne séparation et des valeurs de R_F

TABLEAU I

CARACTÉRISTIQUES CHROMATOGRAPHIQUES ET PHOTOMÉTRIQUES DES FUMITOXINES

Systèmes utilisés: (1) méthanol-chloroforme (2:98); (2) éther éthylique; (3) benzène-acétate d'éthyle (30:70); (4) benzène-acétate d'éthyle (30:70) saturé d'eau; (5) toluène-acétate d'éthyle (50:50) saturé d'acide acétique 1 N.

Toxine	R_F					Constantes spectrophotométriques solns. de 20 µg/ml	
	Adsorption			Partition		$\lambda_{max.}$	Densité optique
	1	2	3	4	5		
Fumitoxine A	0.26	0.08	0.09	0.33	0.47	320 334 348	0.540 0.810 0.740
Fumitoxine B	0.37	0.15	0.16	0.43	0.49	320 334 348	0.620 0.750 0.660
Fumitoxine C	0.27	0.13	0.12	0.39	0.49	320 334 348	0.670 0.840 0.780
Fumitoxine D	0.23	0.01	0.05	0.21	0.43	320 334 348	0.710 0.760 0.640

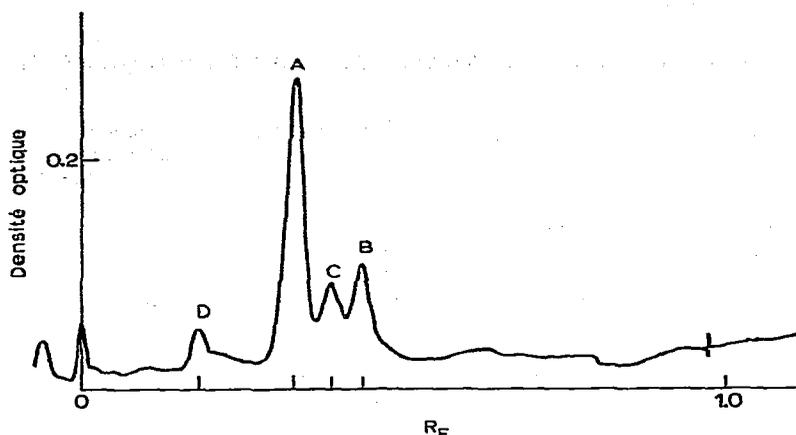


Fig. 1. Courbe photodensitométrique du chromatogramme d'une séparation sur couche mince des fumitoxines A, B, C et D dans un extrait de culture d'*A. fumigatus*. Plaque de gel de silice 60 (Merck) de 0.25 mm d'épaisseur, développée en benzène-acétate d'éthyle (30:70) saturé d'eau. Photomètre intégrateur enregistreur PHI-5 Vernon, source "Mercure" haute pression, bande d'émission à 365 nm.

très reproductibles (écart type: ± 0.02 pour 8 essais). Le système choisi pour les mesures photodensitométriques est un mélange benzène-acétate d'éthyle 30:70 (v/v) saturé d'eau (Fig. 1). Dans les extraits bruts, la séparation peut être sensiblement améliorée par la technique du développement multiple (2 à 3 développements).

Les spectres d'absorption dans l'UV des fumitoxines en solution éthanolique présentent les trois mêmes λ_{\max} ; pour chacun de ceux-ci, les densités optiques sont très proches (Tableau I). L'essentiel de l'absorption se fait dans l'UV de grande longueur d'onde (330-350 nm). Ceci rend possible des mesures photodensitométriques par transparence, au travers de couches minces dont le support, en verre, n'arrête que

TABLEAU II

RELATION ENTRE LES QUANTITÉS DE FUMITOXINE A DÉPOSÉE ET L'ABSORPTION DANS L'UV EN CCM

Quantité de toxine déposée (μg)	Lecture		Erreur (%)	Nombre d'essais
	Intégration (coups)	Surface des pics (mm^2)		
20	370.5	1482	3.2	11
15	334.7	1320	2.8	9
10	321.7	1161	3.3	9
5	181.3	623	3.4	9
2	73.2	292	4.2	11
1	38.4	153	4.6	9
0.8	33.5	134	6.5	11
0.4	20.7	83	6.2	6
0.2	13.7	55	8.4	6
0.1	6.7	27	9.7	11
0.05	—	14	32	6
0.027	limite de détection		—	—

TABLEAU III

DOSAGE DE LA FUMITOXINE A DANS UN EXTRAIT CONTAMINÉ DE DRECHE DE BETTERAVE

Concn. de fumitoxine incorporée (10^{-6})	Concn. mesurée (10^{-6})	Écart type pour 6 essais	Erreur maximum (%)	Volume d'échantillon déposé (μg) *
10	9.83	0.05	2.2	10
5	4.82	0.05	4.8	10
1	1.03	0.02	5.0	10
0.5	0.52	0.03	10.0	20
0.1	0.12	0.02	44.0	30
0.05	non dosable	—	—	(50)

* L'extrait dégraissé de 50 g de drêche est repris par 2 ml de chloroforme.

les rayonnements de courte longueur d'onde. Les résultats de l'analyse des chromatogrammes par cette technique sont rapportés dans le Tableau II. Les mesures n'ont été effectuées que sur la fumitoxine A, la plus abondante dans les extraits de cultures fongiques et l'une des plus toxiques sur l'embryon de poulet^{4,5}, mais les constantes présentées plus haut montrent que la méthode peut être également utilisée pour les trois autres.

La visualisation au moyen de la plaque de cellulose est possible pour des quantités comprises entre 0.02 et 0.04 μg mais cette évaluation approximative n'est pas applicable à un dosage.

Par photodensitométrie, la limite de détection est environ 0.03 μg ; mais au delà de 0.1 μg , l'erreur est égale ou supérieure à 10%.

L'application de la méthode à l'analyse d'un produit végétal n'apparaît possible que dans le cas de concentrations de fumitoxine supérieures à $0.5 \cdot 10^{-6}$ (Tableau III); pour des concentrations plus faibles, le volume d'échantillon à déposer est incompatible avec une résolution correcte sur couche mince. En revanche la méthode est utilisable dans l'étude de la production des fumitoxines par des cultures d'*A. fumigatus*, les concentrations dans les extraits étant de l'ordre de $1 \cdot 10^{-2}$ à $1 \cdot 10^{-4}$.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 B. J. Wilson, dans A. Ciegler, S. Kadis et S. J. Ajl (Rédacteurs), *Microbial Toxins*, Vol. VI, Academic Press, New York, 1971, p. 208.
- 2 A. Taylor, dans S. Kadis, A. Ciegler et S. J. Ajl (Rédacteurs), *Microbial Toxins*, Vol. VII, Academic Press, New York, 1971, p. 337.
- 3 K. Yokota, H. Shimada, A. Kamaguchi et O. Sakagushi, *Microbiol. Immunol.*, 21 (1977) 11.
- 4 J. P. Debeaupuis et P. Lafont, *C.R. Acad. Sci., Ser. D*, 286 (1978) 431.
- 5 J. P. Debeaupuis et P. Lafont, *Appl. Environ. Microbiol.*, sous presse.