



Validation de la méthode de détermination du Benzo(a)pyrène dans des poissons frais et fumés vendus et consommés en Côte d'Ivoire

Y. AKE ASSI^{1,3}✉, G.H.M. BIEGO², K.M. KOFFI^{1,2}, P. KOUAME^{1,3}
L. ACHI¹ et B. BONFOH⁴

¹ Laboratoire Central pour l'Hygiène Alimentaire et l'Agro-Industrie, LANADA, Ministère de la Production Animale et des Ressources Halieutiques, 04 BP 612 Abidjan 22, Côte d'Ivoire,

² Laboratoire de Biochimie et des Sciences des Aliments, UFR Biosciences, Université de Cocody-Abidjan 22 BP 582 Abidjan 22, Côte d'Ivoire,

³ UFR Sciences et Technologie des Aliments, Université d'Abobo-Adjamé, 02 BP 801 Abidjan 02, Côte d'Ivoire

⁴ Centre Suisse de Recherches Scientifiques de Côte d'Ivoire, 01 BP 1303 Abidjan 01, Côte d'Ivoire

✉ Correspondance et tirés à part, e-mail : aaay02@yahoo.fr

Résumé

La validation intra laboratoire d'une méthode d'analyse est définie comme l'action de soumettre une méthode d'analyse à une étude statistique, fondée sur un protocole normalisé et/ou reconnu, et apportant la preuve que dans son domaine d'application, la méthode d'analyse satisfait à des critères de performance pré-établis. Dans notre étude, nous avons utilisé la norme NFV03-110 pour valider en interne la méthode de dosage du benzo(a)pyrène (BaP) dans les poissons frais et fumés, en respectant les exigences spécifiques, de la norme ISO/DIS/15753, applicables à la Chromatographie liquide haute performance. Les tests de la validation ont été réalisés à partir de 2 échantillons de référence, obtenus auprès du réseau BIPEA, dont les concentrations en BaP sont certifiées. La linéarité de l'étalonnage établie entre 0 et 10 µg/L a été prouvée en déterminant le coefficient de détermination ($R^2 = 0,999$). Les limites de détection et de quantification sont respectivement de 0,03 µg/kg et 0,10 µg/kg. Les coefficients de variation des tests de répétabilité et de reproductibilité sont inférieurs à 4%. Les pourcentages de recouvrement des ajouts dosés sont proches de 100%. Par ailleurs, le test de conformité n'a pas révélé de différence significative entre les concentrations en BaP obtenues et les valeurs certifiées par le réseau BIPEA. La méthode de dosage du benzo(a)pyrène peut être considérée comme acceptable. Après cette validation, des concentrations en BaP ont été mesurées dans des échantillons de poissons frais et fumés. Les teneurs retrouvées sont respectivement de $0,52 \pm 0,48$ µg/kg et $7,65 \pm 6,91$ µg/kg (**RASPA**, 8 (S) : 53 - 58).

Mots-clés : Benzo(a)pyrène - Poisson - Méthode de validation (HPLC)

Abstract

Validation of the method for determining benzo (a) pyrene in fresh and smoked fish sold and consumed in Côte d'Ivoire

The validation of a method of analysis in a laboratory is defined as submitting a method of analysis to a statistical study, based on a normalized and/or recognized protocol, bringing the proof that in its field of application, the method of analysis fulfils pre-established criteria of performance. In our study, we used NFV03-110 norm to internally validate the method of Benzo(a)pyrene (B(a)P) measurement in seafood, respecting specific requirements to be applied to high performance liquid chromatography ISO/DIS/15753. The validation was made by characterizing the linearity established between 25 and 200 ppb as well as the limits of detection (0.03 µg/kg) and quantification (0.1 µg/kg), then the internal tests of repeatability and reproducibility were estimated acceptable. After the validation of the method of PAH measurement, mean concentrations of 2.6 ppm of B(a)P were found in the samples of fresh and smoked fish. The application of good practices of transformation allows to reduce the contaminations and the risks linked to consumers' exposure.

Key – Words: Benzo(a)pyrene - Fish - High – Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Introduction

Le secteur de la pêche artisanale, source d'emplois, de revenus et de devises, enregistre des pertes significatives après captures du fait du manque d'infrastructures de conservation appropriées [1], [2].

Ainsi, plus de 80% du poisson consommé en Côte d'Ivoire seraient issus de la transformation artisanale (séchage, friture, fumage) qui produirait dans certaines conditions des substances toxiques telles que les

hydrocarbures aromatiques polycycliques [3], [4]. Ces composés sont démontrés être cancérigène, mutagène et tératogène. Par ailleurs, malgré le faible volume du poisson fumé exporté (3% de la production nationale), ce sous secteur est source d'importantes devises [5].

En 2006, l'introduction dans la zone euro d'un règlement (CE N°1881/2006) [6], fixant les limites maximales de certains contaminants dans les produits alimentaires

dont les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans les poissons fumés, a occasionné la mise sous contrôle renforcé de tous les établissements de traitement de poissons fumés et créé une crise de rentabilité dans ce secteur. Le contrôle impose la connaissance du niveau de contamination des produits halieutiques fumés en hydrocarbures aromatiques polycycliques et plus particulièrement en benzo(a)pyrène.

La première étape de cette démarche est la validation de la méthode de détermination du benzo(a)pyrène, seul hydrocarbure aromatique polycyclique documenté par l'Organisation Mondiale de la Santé.

Matériel et Méthodes

1. MATÉRIEL BIOLOGIQUE

Pour réaliser cette étude, 2 échantillons de références obtenus auprès du réseau BIPEA, ont été utilisés. Il s'agit d'un échantillon d'huile (1-1544-0018-2009) et d'un échantillon de céréales (1-1844-0031) à des concentrations en benzo(a)pyrène respectivement de 1,2 µg/kg et 0,5 µg/kg. Des échantillons de poissons frais et fumés collectés, au premier trimestre 2010, par les Services Officiels d'Inspection du Ministère de la Production Animale et des Ressources Halieutiques (MIPARH) ont également été utilisés. Il s'agit de Tilapia (*Tilapia spp*), Capitaine (*Galeoides decadactylus*), Ceinture (*Trichiurus lepturus*), Machoiron (*Arius sp*) et Saria (*Decapterus punctatus*).

2. RÉACTIFS

Pour le benzo(a)pyrène : solution étalon de benzo(a)pyrène (BaP) à 1 g/L (Chiron AS) ; acétonitrile grade HPLC (Scharlau Chemie S.A); acétone grade HPLC (Scharlau Chemie S.A); méthanol grade HPLC (Scharlau Chemie S.A.) ; N-hexane grade HPLC (Carlo Erba) ; toluène grade HPLC (Labosi); Dichlorométhane grade HPLC (Carlo Erba) ; eau déionisée grade HPLC (Panreac Quimica SA). Pour le dosage des matières grasses : acide chlorhydrique 37% (Carlo Erba Réactifs SA), N-Hexane 96% extra pure (Scharlau chimie SA).

3. APPAREILLAGE

Le dosage du BaP a été réalisé sur un Chromatographe Liquide Haute Performance de marque Prominence Dual HGE de Shimadzu équipé d'un détecteur UV-Visible (Prominence UV-Vis SPD 20 A), d'une pompe (Prominence Chromatograph LC 20AD), d'un injecteur automatique (Prominence autosampler SIL 20AC) et d'une colonne (Prominence Column Owen CTO 20A) type Prévail C18 (15 m x 4,6 mm x 5 µm). L'extraction des matières grasses a été faite avec un Soxhlet (Sibata 34/45) comprenant 4 postes. Les conditions opératoires du HPLC sont présentées dans le Tableau I.

Tableau I : Conditions opératoires du chromatographe HPLC

Température de la salle	26°C
Colonne C18	40°C
Gradient binaire	Solvant A : eau Solvant B : acétonitrile
Débit	1,5 mL/ minute
Longueur d'onde	254 nm

4. MÉTHODE DE VALIDATION

La validation de la méthode de détermination du BaP a été réalisée selon la méthode de l'association française de normalisation (NFV03-110, 1998) [7]. Cette procédure comprend l'étude de la linéarité de la gamme d'étalonnage, la détermination des limites de détection et de quantification, le calcul du coefficient de variation pour les essais de répétabilité et de reproductibilité, ainsi que le calcul du pourcentage de recouvrement pour l'essai de la justesse. Les échantillons de références d'huile et de céréales ont été utilisés pour comparer les concentrations en BaP obtenues avec les valeurs certifiées.

4.1. Test de la linéarité

La linéarité a été testée entre 0 et 10 µg/L à l'aide de 5 points d'étalonnage (0 µg/L, 2,5 µg/L, 5 µg/L, 7,5 µg/L et 10 µg/L). Cinq essais distincts ont été effectués.

4.2. Limites de détection et de quantification

Les limites de détection (LD) et de quantification (LQ) ont été calculées à partir du blanc matrice et 10 essais distincts ont été analysés par HPLC.

LD = Moyenne (Mx) + 3 écart type (s)

LQ = Moyenne (Mx) + 10 écart type (s)

4.3. Tests de répétabilité et de reproductibilité

Pour le test de la répétabilité, 10 essais d'extrait d'échantillon de référence d'huile ont été analysés par HPLC.

Pour la reproductibilité, 5 prises d'essais distinctes d'échantillon de référence d'huile ont été analysées par HPLC à plusieurs jours d'intervalles; soit 15 essais au total.

4.4. Test de la justesse

Dix prises d'essais distinctes des échantillons de référence d'huile et de céréales ont été analysées pour apprécier le taux de récupération par la méthode de détermination du BaP.

5. MÉTHODE DE DOSAGE DES MATIÈRES GRASSES

Les matières grasses ont été extraites par la méthode au Soxhlet [8]. Une prise d'essai de 10 g de chair de poisson (M) a été introduite dans une cartouche Wattman préalablement tarée qui a été ensuite placée dans un extracteur. Un ballon contenant 300 mL d'hexane (M1) a été connecté au système chauffé sur une calotte de marque Selecta. Huit heures après, le ballon est retiré du Soxhlet et le solvant chassé à l'évaporateur rotatif de marque Janke et Kunkel-RV05-ST. Le ballon a été ensuite séché à l'étuve à 80°C pendant 24 heures puis pesé (M2). La teneur en matières grasses a été calculée selon la formule suivante :

$$\% \text{ Matières grasses} = (M2-M1) \times 100/M$$

6. MÉTHODE D'EXTRACTION DU BAP

L'extraction et l'analyse du BaP ont été réalisées selon la norme ISO 15753-2004 [9]. Une prise d'essai de 2,5g de chair de poisson ou d'échantillon de référence est introduite dans un tube à centrifuger puis 10mL d'un mélange acétonitrile/acétone (V/V ; 60/40) sont ajoutés. L'ensemble est homogénéisé au vortex pendant 30 secondes, et à ultra sons pendant 5 minutes

avant d'être centrifugé pendant 5 minutes à 4000 tours/minutes. La phase supérieure est prélevée et transférée dans un tube conique taré et le solvant est évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif à 35°C. L'extraction est répétée deux fois avec 10 mL de mélange acétonitrile/acétone. La phase supérieure est prélevée et transférée dans un tube conique taré et le solvant est évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif à 35°C. L'extraction est répétée deux fois avec 10 mL de mélange acétonitrile/acétone. L'extrait est ensuite purifié sur des cartouches de phase greffée en C18 (Waters SEP Pack). Pour se faire, 2 mL du mélange acétonitrile/acétone sont introduits dans un tube conique contenant l'extrait qui est agité au vortex pendant 15 secondes puis centrifugé pendant 30 secondes. La phase supérieure est transférée dans un tube et l'opération est répétée deux fois. Les différents surnageants sont transférés sur une cartouche C18 préalablement conditionnée avec 12 mL de méthanol et 12 mL d'acétonitrile. L'élution a été effectuée avec 5 mL du mélange acétonitrile/acétone à la pression atmosphérique. Ensuite l'éluat est concentré à l'aide d'un évaporateur rotatif à 35°C à 50 mg. L'extrait purifié est récupéré dans 1 mL d'hexane. Le tube est serti et conservé à -18°C avant analyse.

7. ANALYSE STATISTIQUE

Le traitement statistique a été effectué à l'aide du logiciel SPSS 12 et le seuil de significativité statistique a été fixé à 0,05. Les concentrations moyennes du BaP ont été calculées avec leur écart type; puis les coefficients de variation ont été obtenus pour exprimer la répétabilité et la reproductibilité. Le carré du coefficient de corrélation de Pearson (R^2) a été calculé pour apprécier la linéarité. Le pourcentage de recouvrement a été calculé pour exprimer le rendement d'extraction. Les concentrations moyennes et le domaine de variation des concentrations du BaP ont été utilisés pour décrire le niveau de contamination des échantillons de poissons frais et séchés. Le test de conformité au risque 5% a été utilisé pour comparer les concentrations obtenues aux valeurs de référence et le test de Student au risque 5% a servi à comparer les concentrations moyennes obtenues dans les poissons frais et séchés.

Résultats

1. RÉSULTATS DE LA VALIDATION DE LA MÉTHODE DE DÉTERMINATION DU BaP

La validation de la méthode de détermination du BaP a porté sur les tests de la linéarité, de la répétabilité, de la reproductibilité, de la justesse et des limites de détection et de quantification. Les résultats de cette étude sont consignés dans le Tableau II. La figure 1 présente le chromatogramme de l'essai contenant le BaP à une concentration de 5 µg / L.

Le coefficient de détermination obtenue pour l'étude de la linéarité est égal à 0,9995. Les limites de détection et de quantification obtenues correspondent respectivement à 0,03 µg/kg et 0,10 µg/kg. Les coefficients de variations calculés pour les tests de répétabilité sont de 1,24% pour le standard de benzo(a)pyrène à une concentration de 5 µg/L, de 2,62% et 3,80% respectivement pour les échantillons de référence d'huile et de céréales. Quant aux tests de reproductibilité, les coefficients de variation mesurés sont de 2,04%, 3,80% et 3,97% respectivement pour les échantillons de standard de BaP, d'huile et de céréales. Les pourcentages de recouvrement obtenus pour les tests de justesse sont de $97 \pm 1,8\%$ et $109 \pm 5,3\%$ respectivement pour les échantillons certifiés en BaP d'huile et de céréales. Le test de conformité n'a pas montré de différence significative au risque 0,05 entre les concentrations moyennes en BaP retrouvées dans les échantillons de référence d'huile et de céréales ($1,17 \pm 0,02$ µg/kg et $0,55 \pm 0,03$ µg/kg) et les valeurs certifiées (1,2 µg/kg et 0,50 µg/kg). Les résultats de ce test sont consignés dans le tableau III.

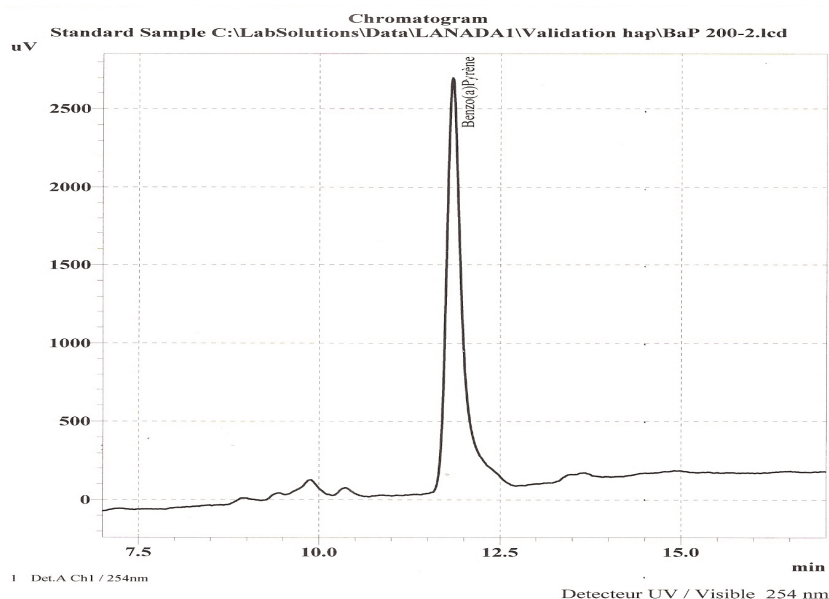


Figure 1: Chromatogramme du dosage du benzo(a)pyrène à 5 µg/L

Tableau II : Résultats des tests de validation de la méthode de détermination du benzo(a)pyrène

Désignation		Valeurs obtenues
Domaine de linéarité	Equation	$y = 2,2066x - 0,0023$
	Coefficient de Pearson R^2	0,9995
Répétabilité (CV en %)	Standard à 5 µg/l	1,24
	Echantillon d'huile 1,2 µg/kg	2,62
	Echantillon de céréale à 0,5 µg/kg	2,86
Reproductibilité	Standard à 5 µg/l	2,04
	Echantillon d'huile 1,2 µg/kg	3,80
	Echantillon de céréale à 0,5 µg/kg	3,97
Limite de détection	LD	0,03 µg/kg
Limite de quantification	LQ	0,10 µg/kg
Justesse (PR en %)	Echantillon d'huile 1,2 µg/kg	$97,3 \pm 1,8$
	Echantillon de céréale à 0,5 µg/kg	$109,2 \pm 5,3$

CV : Coefficient de variation, PR : Pourcentage de recouvrement

Tableau III: Comparaison des concentrations en benzo(a)pyrène retrouvées avec les valeurs certifiées des échantillons de référence

Désignation	Concentration obtenue (µg/kg)	Valeur certifiée
Echantillon d'huile	$1,17 \pm 0,02^a$	1,20 ^a
Echantillon de céréales	$0,55 \pm 0,03^b$	0,50 ^b

Les valeurs portant la même lettre ne sont pas significativement différentes au risque 5%

Tableau IV : Concentrations moyennes en benzo(a)pyrène retrouvées dans les échantillons de poissons

Désignation	Concentrations obtenues (µg/kg)	Valeur normée (mg/kg)
Poissons frais	$0,52 \pm 0,48^a$	2,00
Poissons fumés	$7,65 \pm 6,91^b$	5,0 ^b

Les valeurs portant la même lettre ne sont pas significativement différentes au risque 5%

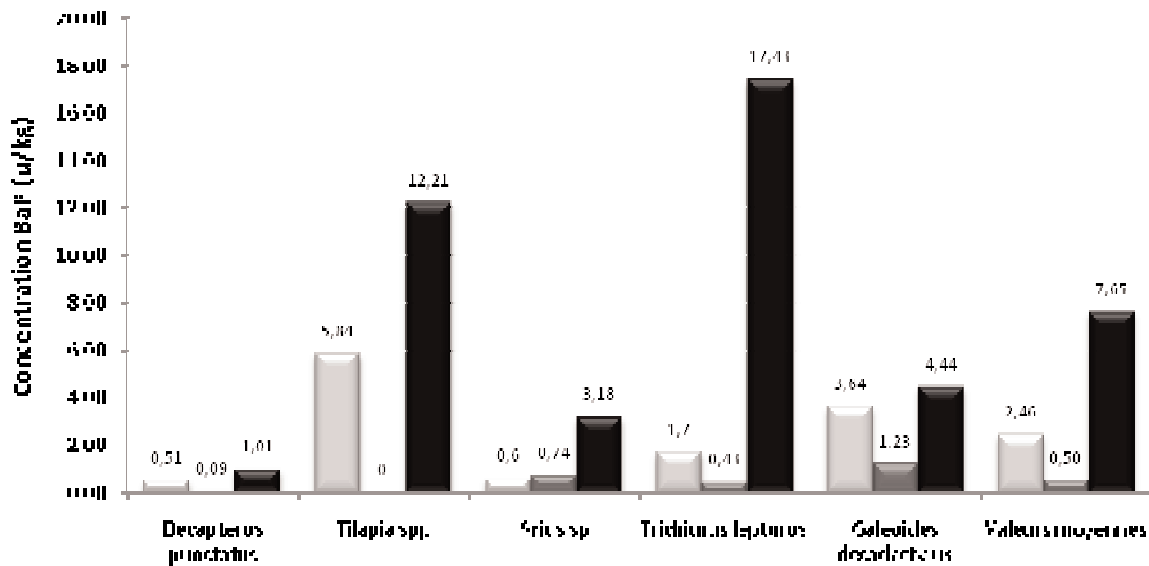


Figure 2 : Concentrations en benzo(a)pyrène et des teneurs en matières grasses en fonction de l'état des poissons

2. CONCENTRATIONS EN BENZO(A)PYRÈNE DES POISSONS FRAIS ET FUMÉS

La figure 2 présente l'évolution des teneurs en matières grasses et des concentrations moyennes en BaP retrouvées dans différentes espèces de poissons aux états frais et fumé. Les teneurs en matières grasses sont comprises entre 0,6% et 9,1% avec une moyenne de $2,9 \pm 2,8\%$. Les concentrations moyennes en BaP sont de $0,5 \pm 0,4 \mu\text{g/kg}$ ($0,1$ - $1,2 \mu\text{g/kg}$) dans les poissons frais et de $7,7 \pm 6,9 \mu\text{g/kg}$ ($1,0$ - $17,4 \mu\text{g/kg}$) dans les poissons fumés. La comparaison des concentrations moyennes mesurées dans les poissons frais montre une différence significative au risque 0,05 (Tableau IV). Ainsi, la concentration moyenne en BaP des poissons fumés est au moins 14 fois celle retrouvée dans les poissons frais. Les concentrations en BaP les plus élevées sont retrouvées dans les poissons gras fumés par rapport à l'état frais comme la ceinture (concentrations de $0,4 \mu\text{g/kg}$ et $17,4 \mu\text{g/kg}$ respectivement dans le produits frais et fumé), le tilapia (concentrations de $0,1 \mu\text{g/kg}$ et $12,2 \mu\text{g/kg}$ respectivement dans le produits frais et fumé).

Discussion

L'étude réalisée a permis de démontrer la fiabilité de la méthode de détermination du benzo(a)pyrène dans les échantillons de poissons frais et fumés. En effet, le test de la linéarité met en évidence la normalité de la distribution aux bornes de l'intervalle de la gamme d'étalonnage [$0,10 \mu\text{g/L}$]. La valeur limite de détection $0,03 \mu\text{g/kg}$ démontre une sensibilité élevée de la

technique de dosage du benzo(a)pyrène. Les coefficients de variations obtenus au cours des tests de répétabilité mettent en évidence la stabilité et la fidélité du chromatographe HPLC ainsi que sa précision. Les tests de reproductibilité confirment les résultats de la répétabilité. Par ailleurs, ils montrent également la fiabilité de la méthode d'extraction du composé. Les ajouts dosés et la détermination des concentrations certifiées des échantillons de référence montrent l'exactitude des résultats du dosage des différents échantillons car aucune différence significative n'a été obtenue avec le test de conformité. Les résultats de l'étude de la validité de la méthode de détermination du benzo(a)pyrène sont conformes aux valeurs mettant en évidence l'acceptabilité d'une technique analytique comme affirmée par les experts du comité mixte FAO/AIEA [10] et documentée dans le recueil sur les méthodes standards de l'Association Américaine de Santé Publique [11]. L'analyse des échantillons de poissons frais et fumés révèlent la présence du benzo(a)pyrène à des concentrations variables comprises entre $0,03$ et $17,43 \mu\text{g/kg}$ de poisson. Les concentrations élevées sont retrouvées dans les échantillons de poissons fumées ($7,65 \pm 6,91 \mu\text{g/kg}$) par rapport aux concentrations en BaP des poissons frais ($0,52 \pm 0,48 \mu\text{g/kg}$). La présence de fortes teneurs en hydrocarbures aromatiques polycycliques dans les produits fumés est connue depuis longtemps. Les fonctions préservatrices, d'aromatization et de coloration sont bien corrélées à l'apport de fumée. Cependant, la fumée véhicule des hydrocarbures polycycliques aromatiques (HAP), connus depuis plusieurs décennies [12], [13], [14].

Dans leur étude sur le fumage des poissons en Afrique de l'Ouest pour les marchés locaux et d'exportation, RIVIER et son équipe [2] ont démontré l'importance du fumage dans l'apparition des HAP dans les poissons. Par ailleurs, notre étude révèle également que les concentrations en BaP sont plus élevées dans les échantillons de poissons gras fumés que ceux de poissons maigres (figure 2). En 1995, KNOCKAERT [15] a montré l'importance de la matière grasse dans la pyrosynthèse des HAP. Les concentrations obtenues sont toutes inférieures aux valeurs limites (2 mg/kg dans la chair des poissons frais et 5 mg/kg dans les poissons fumés) préconisées par le règlement 1881/2006 de la Commission de l'Union Européenne [6].

Conclusion

L'étude réalisée montre l'acceptabilité de la méthode de détermination du benzo(a)pyrène dans les poissons. La validation est indispensable à l'évaluation du risque des hydrocarbures aromatiques polycyclique dans le poisson et plus largement dans les denrées alimentaires afin d'envisager une gestion durable de la toxicité de ces composés pour le consommateur ivoirien et de la qualité du produit mis à la disposition des marchés locaux et extérieurs.

Remerciements

Cette étude a été financée par le Programme d'Appui Stratégique à la recherche (PASRES) et la GTZ/ BMZ à travers International Livestock Research Institute et le Centre Suisse de Recherches Scientifiques en Côte d'Ivoire. Nous tenons également à remercier l'équipe du laboratoire du CSRS du LANADA et l'ensemble des acteurs de la filière poisson fumée en Côte d'Ivoire.

Bibliographie

1. GRET, 1993.- Conserver et transformer le poisson : Guide technique et méthodologique. Saint – Etienne : Edition Le Point Sur, Ministère de la Coopération. 286 p.

2. RIVIER M., KEBE F., GOLI T., 2009.- Fumage de poissons en Afrique de l'Ouest pour les marchés locaux et d'exportation. Rapport de l'Agence Universitaire de la Francophonie. 19 p.
3. BERNAL-MARTINEZ A., 2005.- Elimination des hydrocarbures aromatiques polycycliques présents dans les boues d'épuration par couplage ozonation – digestion anaérobie. Thèse de doctorat d'Université Montpellier II. 222 p.
4. VISCIANO P., PERUGINI M., AMORENA M., IANERI A., 2006.- Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) dans les filets de saumon Atlantique frais et fumés à froid, *J. Food prot.*, 69 (5): 1134-1138.
5. DIRECTION DES PRODUCTIONS HALIEUTIQUES, 2007.- Annuaire des statistiques des pêches et de l'aquaculture. Abidjan : Service des statistiques et de la documentation, Ministère de la Production Animale et des Ressources Halieutiques. 115 p.
6. COMMISSION EUROPEENNE, 2006.- Règlement de la Commission Européenne N°1881 du 19 décembre 2006 portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires. Journal Officiel de l'Union Européenne, 364, 5-22.
7. ASSOCIATION FRANCAISE DE NORMALISATION, 1998.- Analyse des produits agricoles et alimentaires: Procédure de validation intralaboratoire d'une méthode alternative par rapport à une méthode de référence. Paris : Edition AFNOR. 40 p.
8. AOAC, 1975.- Analytic Official Methods of Analysis of the Association Chemists.-Washington DC: 12th edition. - 69, 626-627.
9. INTERNATIONAL STANDARD ORGANISATION, 2004.- Corps gras d'origine animale et végétale – Détermination des hydrocarbures aromatiques polycycliques. Genève : ISO 15 753. 21 p.
10. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 1997.- Validation of analytical methods for food control. - Vienna: Report of joint FAO/IAEA Expert Consultation.- 18 p.
11. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2005.- Standard methods for the examination of water and wastewater.- Washington DC: Franson M. A. H. 17th edition.- 72 p.
12. THYS E., HARDOUIN J., 1983.- Aspect organoleptique et taux en 3,4 benzopyrène du poisson fumé commercialisé à Maroua (Nord-Cameroun). *Ann. Soc. Belge Méd. Trop.*, 63: 69-72.
13. LENGES J., LUKS D., VO THI N. B., 1976.- Dosage du 3,4 benzopyrène dans les produits de viande et de poissons fumés. *Revue Ferm. Ind. Alim.*, 31: 20-22.
14. AGENCE FRANCAISE DE SECURITE SANITAIRE DES ALIMENTS, 2007.- Evaluation des risques sanitaires liés aux situations de dépassements des limites et références de qualité des eaux destinées à la consommation humaine. Nancy : Edition AFSSA, Tome I. 250 p.
15. KNOCKAERT C., 1995.- Fumage électrostatique: application aux produits de la mer.- Nantes: IFREMER.- 110 p.

