Recherche d'aflatoxine M₁ dans les poudres de lactosérum

Évaluation saisonnière de la contamination

par

J. M. FREMY* et A. GAYMARD*

(avec la collaboration technique de TERRIER (Carole) et GOYON (D.)

INTRODUCTION

Diverses expérimentations ont montré que l'aflatoxine M₁ est un des métabolites d'excrétion de l'aflatoxine B₁ et qu'elle peut donc être rencontrée dans le lait [5]. Des contaminations très faibles en aflatoxine M₁ peuvent être rencontrées dans des laits de consommation courante [6].

Plusieurs équipes de chercheurs ont décrit les modalités du devenir de l'aflatoxine M₁ lors de l'utilisation de lait contaminé pour la fabrication de fromage. D'après les travaux que nous avons réalisés récemment [2] il semble que l'aflatoxine M₁ se distribue de manière égale entre le caillé et le sérum. Les travaux réalisés par Van Egmond [8] en 1976 et ceux de Grant *et al.* [3] sur ce sujet, aboutissent aux mêmes résultats. D'autre part la teneur en aflatoxine semble diminuer au cours de l'affinage du fromage [2]. D'ailleurs une enquête réalisée en 1976-1977 sur des Camemberts n'a révélé aucune contamination en aflatoxine M₁ encore que la limite de détection de la méthode utilisée à cette époque fut élevée : 2,5 p.p.b. [1].

D'une manière générale, le lactosérum issu de la fabrication du fromage est transformé en poudre et devient de ce fait un produit relativement « stable ». Il nous a paru intéressant d'évaluer le niveau de contamination dans les lactosérums en poudre et de voir si l'on pouvait établir une relation entre une éventuelle contamination de ceux-ci et la période de fabrication.

* Ministère de l'Agriculture, Direction de la Qualité, Services Vétérinaires, Laboratoire Central d'Hygiène Alimentaire, 43, rue de Dantzig - 75015 Paris.

I. MATERIEL ET METHODES

1.1. Echantillonnage

Des prélèvements ont été effectués dans dix-sept usines de production de lactosérum entre le mois de novembre 1977 et le mois de septembre 1979. Un total de quatre-vingt-six échantillons de poudres de lactosérum provenant exclusivement de fromageries a pu être rassemblé. Chaque année a été divisée en haute saison : de début mai à fin octobre et basse saison : de novembre à fin avril. Le protocole analytique utilise 50 g de poudre de lactosérum, ce qui revient à effectuer l'examen sur environ 740 ml de lactosérum liquide.

L'autre volet de l'étude a consisté à réunir des échantillons en provenance de la totalité des usines de traitement de lactosérum en France. Soixante-quatorze échantillons ont été prélevés au cours du mois de mai 1979 dans soixante et une usines réparties dans trente-huit départements (fig. 1).

fig. 1

Lieux des prélèvements des poudres de lactosérum

- Prélèvements de mai 1979.
- Prélèvements de nov. 1977 à sept. 1979.

1.2. Mode opératoire

L'extraction et la purification ont été effectuées selon la technique de Kiermeier [4] pour tous les prélèvements durant les deux années.

Chaque extrait purifié est repris dans 0,2 ml de benzène acétonitrile (98 : 2) et examiné en chromatographie en couche mince. Les plaques de gel de silice utilisées sont du type M.N.G.H.R. (Macherey-Nagel) 20×20 mm prêtes à l'emploi de 0,25 mm d'épaisseur. La technique de développement est bidimensionnelle et se réfère aux travaux de Trucksess [7] et Van Egmond [9]. Elle est donc utilisée comme technique de confirmation. Deux systèmes de solvants sont utilisés :

Direction 1 : éther/méthanol/eau (96 : 3 : 1).

Direction 2 : chloroforme/acétone/propanol (87 : 10 : 3).

A l'issue de ce double développement, la plaque est observée sous U.V. long (366 nm) en boîte noire par transillumination (Prolabo C 62 - ondes longues 366 nm).

Toute tache suspecte est repérée et dosée au fluorodensitomètre Vernon en se référant aux taches d'aflatoxine M_1 standard qui ont migré dans les deux directions à partir d'une solution étalon à 1 μg d'Af. M_1 /ml de benzène acétonitrile (98 : 2). Pour la confirmation de la tache suspecte, on utilise la technique de Van Egmond [9] par réaction à l'acide-trifluoroacétique avec comme système solvant : chloroforme/éthanol/acide acétique/eau (92 : 8 : 2 : 0,8) la plaque est développée à nouveau dans la direction 1. Pour fixer les intensités de fluorescence, la plaque est révélée à l'acide sulfurique 50 p. 100.

II. RESULTATS

1° Limite et rendement du dosage

La limite de visibilité de l'aflatoxine M_1 standard de plaque est de 0,1 ng, la limite de dosage par le fluorodensitomètre est de 0,2 ng. Les Rf. obtenus avec les solvants de développement sont respectivement de 0,25 pour le système 1, 0,30 pour le système 2, 0,7 pour Af. M_1 non dérivée et 0,4 pour l'Af. M_1 dérivée dans le système 3.

Les rendements d'analyses obtenus sont consignés au tableau 1. On observe que ceux-ci oscillent autour de 80 p. 100 mais avec une incertitude croissante à mesure que la contamination diminue.

En relation avec les résultats obtenus, nous avons pu établir différentes classes de contamination choisie arbitrairement. Ne sont considérés comme quantité mesurable en Af. M_1 que les résultats obtenus sur les poudres contenant une valeur supérieure ou égale

TABLEAU 1

Rendements d'analyse pour les poudres de lactosérum supplémentées en Af. M₁

Contamination initiale en p.p.b.	Nombre d'échantillons	p. 100 d'Af. M ₁ retrouvée	Pourcentage incertitude
5	4	75	± 10
1	5	80	± 15
0,5	4	80	± 25
0,1	5	non retrouvée	

à 0,5 p.p.b. Au-dessous de cette valeur, les poudres sont supposées ne contenir que des traces d'Af. M₁ (classe « traces »). Enfin les poudres négatives (où l'Af. M₁ n'a pas été détectée) ont de façon certaine une contamination inférieure à 0,1 p.p.b. (classe « ND »).

2° Résultats des analyses

Ils sont consignés dans les tableaux 2 et 3. En plus des deux classes énoncées précédemment : (classe « ND », classe « traces »), les poudres ayant une teneur en Af. M₁ supérieure ou égale à 0,5 p.p.b. sont subdivisées en trois classes (0,5 à 0,9), (1,0 à 1,9), (2 et +).

2.1. Evaluation saisonnière de la contamination

Lorsqu'on examine le tableau 2, on observe que sur les quatre-vingt-six poudres, trente-cinq ont une valeur mesurable en Af. M₁ (0,5 p.p.b.) et une seule contient une teneur supérieure à 5 p.p.b. (6,5 p.p.b. exactement). Donc si l'on se réfère à la récente réglementation parue au J.O. du 16-2-80 concernant la teneur en aflatoxines dans les lactosérums en poudre qui fixe la teneur maximale à 5 p.p.b., seule cette poudre se situe hors de la norme.

Nous disposons d'un nombre de prélèvements suffisant pour utiliser un test statistique afin de voir s'il existe ou non une relation entre le niveau de contamination et la saison. Nous nous proposons d'utiliser le test du χ^2 . Pour ce faire, nous rassemblons les effectifs des hivers (77-78 et 78-79) et des étés (78 + 79) en calculant les pourcentages respectifs. Le graphique 1 rassemble ces données. Le tableau 2 rassemble les chiffres entrant dans le calcul du test du χ^2 .

TABLEAU 2

Effectifs observés et effectifs calculés () selon les saisons

Af. M ₁ p.p.b.	N.D.	Traces	0,5 à 0,9	1 à 1,9	2 et +	
Saisons						
Hivers	8 (14,24)	12 (14,8)	11 (7,4)	11 (7,4)	7 (5,1)	49
Etés	17 (10,8)	14 (11,2)	2 (5,6)	2 (5,6)	2 (3,9)	37
Totaux	25	26	13	13	9	86

TABLEAU 3

Répartition géographique et niveau de contamination des poudres de lactosérum prélevées au mois de mai 1979

Af. M ₁	ND ≤ 0,1	Non mesurables	Mesures en p.p.b. de poudre			Total
Régions			0,5 à 0,9	1 à 1,9	2 et +	
Normandie	2	6	2	0	0	10
Bretagne	0	7	1	0	0	8
Pays de Loire	3	6	1	1	0	11
Est	1	6	3	0	0	10
Nord	0	0	0	2	4	6
Sud-ouest	1	2	4	1	0	8
Auvergne	1	1	2	0	0	4
Berry-Poitou Charentes	2	7	1	3	0	13
Rhône-Alpes	0	1	1	1	1	4
Total	10	36	15	8	5	74
France

fig. 2

Répartition du niveau de contamination selon la période de l'année.

Rappelons que la valeur du χ^2 s'exprime selon :

$$\chi^2 = \frac{(\text{effectif observé} - \text{effectif calculé})^2}{\text{effectif calculé}}$$

dans cette étude, l'effectif calculé =

$$\frac{\text{effectif de la saison} \times \text{effectif de la classe}}{\text{effectif total}}$$

ce qui donne par exemple pour la case « non détectés en hiver »

$$\text{un effectif calculé : } \frac{49 \times 25}{86} = 14,24.$$

Il est à noter que les effectifs calculés dans la case « 2 p.p.b. et + en été » étant inférieur à 5, nous sommes là encore contraints de rassembler les deux dernières colonnes pour rendre possible le calcul du χ^2 en une seule classe : « 1 p.p.b. et + », soit pour :

$$\text{« Hivers »} = (7,4) + (5,1) = 12,5$$

$$\text{« Etés »} = (5,6) + (3,9) = 9,5$$

on obtient alors : $\chi^2 = 19,2$ avec trois degrés de liberté.

Les tables correspondant à ces chiffres permettent de connaître le risque que l'on prend en rejetant l'hypothèse. Pour notre cas, ce risque est inférieur à 0,1 p. 100. Cela nous permet de rejeter avec sécurité, l'hypothèse d'indépendance des deux variables « saison » et « contamination », autrement dit, on peut avancer qu'il existe une relation significative entre la saison et le niveau de contamination. Le graphique 1 visualise cette constatation.

Il apparaît d'ailleurs logique que les poudres « d'hiver » aient un niveau de contamination plus élevé que celles « d'été », du fait de la modification de régime alimentaire l'hiver sous forme d'apport d'aliments composés.

2.2. Répartition géographique

Lorqu'on examine le tableau 3, on note que sur les soixante-quatorze prélèvements, quarante-six sont non mesurables et non détectables en Af. M_1 et que treize ont une valeur supérieure à 1 μg d'Af. M_1/kg de poudre.

Aucun échantillon ne dépasse le seuil de 2,6 μg d'Af. M_1/kg de poudre.

Il est assez difficile d'établir une répartition géographique de contamination puisque l'on ne dispose le plus souvent que d'un seul prélèvement pour la période considérée, mai 1979.

Néanmoins, on peut observer qu'une proportion majeure des prélèvements issus des régions du Nord et du Rhône-Alpes présente un niveau de contamination supérieur à 1 p.p.b. A l'inverse les régions situées à l'ouest ont une majorité d'échantillons peu contaminés (0,5 p.p.b.).

DISCUSSION

A l'issue de cette étude nous pouvons formuler les remarques suivantes :

— *au point de vue analytique*, la technique Kiermeier est d'utilisation à la fois simple et rapide ce qui est un avantage certain. Cependant, il existe un inconvénient dû à la présence des taches interférentes dans la zone de migration de l'aflatoxine M_1 . Pour tous les extraits que nous avons purifiés à partir des échantillons, la présence d'un grand nombre de taches rend indispensable la C.C.M. en technique bidimensionnelle.

De plus, la présence de taches de fluorescence et de Rf. identiques à ceux de l'Af. M_1 rend le plus souvent obligatoire la confirmation. Ces observations nous conduisent donc à conclure que la méthode Kiermeier doit être considérée comme une méthode délicate d'emploi et finalement peu adaptée à un contrôle qui se veut être rigoureux et aussi précis que possible ;

— *au point de vue des résultats*, il existe un certain décalage entre la date du prélèvement au niveau du stock et la date de récolte du lait. Ce délai exact est inconnu de nous, seule la date du prélèvement est connue et l'on peut considérer le délai de 1 mois entre « production » et « prélèvement » comme délai moyen.

On peut nous reprocher de tirer des conclusions sur un certain nombre d'échantillons trop faible par usine. Cependant les résultats sont assez précis pour montrer, d'une part, que les poudres d'hiver ont un niveau de contamination plus élevé que les poudres d'été et que ce niveau de contamination varie sensiblement selon les régions et que, d'autre part, il n'est pas à exclure une relation entre la teneur en Af. M_1 résiduelle et le régime alimentaire des animaux laitiers selon les régions.

Il faut donc considérer cette étude comme une approche du problème de la contamination en Af. M_1 d'un produit laitier particulier qui présente un certain intérêt en alimentation humaine et animale. En effet le lactosérum est un produit « terminal » d'une chaîne de transformation du lait, et analyser ce produit sous forme de poudre revient à contrôler en fait un grand volume de produit liquide. Cela permet de déceler de très légères contaminations qui seraient passées inaperçues si l'on s'était limité à examiner le produit initial, c'est-à-dire effectuer l'analyse de 50 ml de lait liquide.

Résumé

Un total de quatre-vingt-six prélèvements ont été effectués dans dix-sept usines de traitement de lactosérum entre le mois de novembre 1977 et le mois de septembre 1979. Soixante-quatorze échantillons de poudre de lactosérums ont été également prélevés au cours du mois de mai 1979 issus de soixante et une usines réparties dans trente-huit départements. La totalité des prélèvements provient de traitement de lactosérums résultant de la fabrication de fromages.

La technique de dosage d'aflatoxine M_1 utilisée est la méthode Kiermeier. La séparation utilise la C.C.M. bidimensionnelle et le test de confirmation de Trucksess et Van Egmond est mise en œuvre pour les extraits suspects. Les résultats montrent que la méthode utilisée est imprécise pour des teneurs en Af. M_1 inférieures à 0,5 p.p.b. Il s'avère que les poudres de lactosérums prélevées l'hiver ont un niveau de contamination plus élevé que celles prélevées l'été.

La majorité des poudres ont des quantités en Af. M_1 non mesurables, une seule poudre dépasse le seuil de 5 $\mu\text{g/kg}$ de poudre.

Les prélèvements provenant des régions situées à l'ouest de la France, étant les plus nombreux, sont les moins contaminés.

Summary

OCURRENCE OF AFLATOXIN M₁ IN POWDERED WHEY: Af. M₁ CONTAMINATION DISTRIBUTION ACCORDING TO SEASONS

A study on a great number powdered wheys resulting of cheese making was conducted to know the level of naturally Af. M₁ contamination.

During two years (77 November to 79 September), 86 samples were collected in 17 dairy factories, and during 79 May 74 samples in the greatest number of dairy factories (61) producing powdered wheys.

For all samples Kiermeier method was used. T.L.C. two dimensional development and the Trucksess and Van Egmond confirmation test of Af. M₁ identity were conducted for each extract.

Results show that analytical method does not provide a great precision for under 0,5 µg/kg powdered whey Af. M₁ level.

Kiermeier method is easy to emploiment but several difficulties were appeared in T.L.C. separation step account of metabolites interfering with Af. M₁.

Although winter powdered wheys are more contaminated than summer samples. Only one sample has a higher Af. M₁ content than 5 µg/kg (6,5 µg/kg powder). Generally west country samples have the lowest level of Af. M₁ contamination.

Reçu pour publication en septembre 1980.

Bibliographie

- [1] CORBION (B.) et FRÉMY (J. M.) (1978). — Recherche d'aflatoxine B₁ et M₁ dans des fromages de type Camembert. *Le Lait*, 58, (573-574), 133-140.
- [2] FRÉMY (J. M.) et ROILAND (J. C.) (1979). — Devenir de l'aflatoxine M₁ lors de la fabrication du fromage type Camembert. *Annales de nutrition et d'alimentation*, 33, (5), 619-630.
- [3] GRANT *et al.* (1971). — Partitioning behaviour of aflatoxin M₁ in dairy products. *Bull. Envir. Contam. Toxicol.*, 6, (6), 521-524, d'après *Dairy Sci. Abstract*.
- [4] KIERMEIER (F.) und WEISS (G.) (1976). — Zur Untersuchung von Milch und Milch produkten auf die Aflatoxine B₁ B₂ G₁ G₂ und M₁. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 160, 337-344.
- [5] LAFONT (P.), LAFONT (J.) (1975). — Elimination de l'aflatoxine par la mamelle chez la vache. *Cahiers de Nut. et Diét.*, 10, (1), 55-57.

- [6] SCHULLER *et al.* (1977). — Aflatoxin M₁ in liquid and powdered milk (evaluation of methods and collaborative study). *Zeszyty problemowe postepow nauk rolniczych*, 186, 255-261.
 - [7] TRUCKSESS (M. W.) (1976). — Derivatization procedure for identification of aflatoxin M₁ on a thin layer chromatogram. *J. Assoc. of Annal. Chem.*, 59, 722-723.
 - [8] VAN EGMOND *et al.* (1976). — The effect of processing on the aflatoxin M₁ content of milk and milk products. *I.U.P.A.C. Symposium, Paris*, septembre 1976.
 - [9] VAN EGMOND *et al.* (1978). — Confirmatory test for aflatoxine M₁ on a thin layer plate. *J. Assoc. of Annal. Chem.*, 61, (4), 809-812.
-