Données sur la contamination par l'aflatoxine M₁ du lait et des produits laitiers en France

Résultats de 1 046 analyses effectuées durant la période
allant du 1^{er} septembre 1980 au 30 juin 1981

par

M. BLANC et A. KARLESKIND*

INTRODUCTION

Depuis les travaux d'Allcroft [1, 2, 3] et de Iongh [5], il est connu que les aflatoxines B, ingérées par une vache en lactation, se retrouvent en faibles proportions dans son lait, sous forme de dérivés hydroxylés.

Ceux-ci, dénommés aflatoxines M₁ et M₂ (fig. 1) présentent une toxicité comparable à celle des aflatoxines B₁ et B₂, dont elles dérivent.

L'aflatoxine M₁ a un pouvoir mutagène et cancérigène un peu moindre que celui de l'aflatoxine B₁, mais une même dose de ces deux toxines produisent les mêmes lésions hépatiques chez l'animal [11].

fig. 1

Formules des aflatoxines M₁ et M₂.

* Laboratoires Wolff, 198, rue Sigmund-Freud - 75019 Paris. Tél. : 206-78-30.

La pollution du lait et des produits laitiers par l'aflatoxine M_1 pose donc directement un problème de santé publique, du fait que ces produits sont largement consommés et, ceci généralement par de très jeunes enfants pour lesquels ils constituent l'alimentation de base. Ceci explique donc l'inquiétude actuelle des nutritionnistes et hygiénistes et c'est ainsi que des réglementations fixant des taux limites en aflatoxines M_1 dans le lait et les produits laitiers ont été mises en place par certains pays comme la Suisse ou sont en préparation, comme c'est le cas pour la France.

Les avis étant très partagés sur l'importance réelle du problème de la contamination des produits laitiers en France et, partant, sur les risques qu'ils font encourir aux consommateurs, il nous a semblé intéressant de publier les résultats d'analyses qui ont été effectuées dans nos Laboratoires, sur une période de 10 mois, sur des échantillons de lait et de produits dérivés provenant de diverses régions françaises.

MATERIEL ET METHODES

Echantillons analysés : nature, origine

Nos résultats comprennent l'ensemble des analyses que nous avons effectuées durant la période allant du 1^{er} septembre 1980 au 30 juin 1981 (10 mois), ce qui représente un total de 1 046 dosages d'aflatoxines M_1 , pour lesquels il est possible de faire une répartition en fonction de la nature des produits analysés :

Nature du produit laitier	Nombre de dosages
Lait liquide	380
Poudre de lait	222
Fromages frais	199
Fromages affinés	144
Aliments lactés pour nourrissons	32
Beurre	26
Poudre de lactosérum	22
Lait concentré	12
Crèmes glacées	5
Caséinate	4

fig. 2

Répartition géographique des échantillons analysés.

L'identification de l'origine géographique exacte de l'ensemble des échantillons analysés a été assez difficile à établir, compte tenu du fait que nos dosages correspondent à des analyses commerciales effectuées à la demande de divers établissements laitiers qui ne nous ont pas systématiquement communiqué l'origine de leurs échantillons.

Nous avons pu, cependant, établir une répartition géographique par grandes régions pour 827 échantillons (fig. 2). Il est, ainsi, possible de voir que les prélèvements effectués couvrent assez bien les grandes régions de production laitière française. Ceci ne veut cependant pas dire que les résultats que nous rapportons représentent exactement l'état actuel de la contamination des produits laitiers en France, par suite de l'imprécision de deux paramètres caractérisant les échantillons étudiés qui sont, d'une part, l'origine exacte des prélèvements et, d'autre part, et surtout, l'importance en tonnage que représente chaque échantillon analysé.

Méthodologies analytiques

L'ensemble des échantillons a été analysé suivant la méthode que nous avons publiée dans la Revue des « *Industries Alimentaires et Agricoles* » [4] avec, cependant, une modification quant à la techni-

que d'extraction. Nous nous sommes rapprochés de la méthode de Gauch [7] dans laquelle l'opération d'extraction par solvant est réalisée sur le substrat adsorbé par un support inerte (celite), ce qui évite tous les problèmes d'émulsion rencontrés lors de l'extraction classique en ampoule à décantier.

Le schéma ci-après indique la succession des opérations effectuées :

Schéma de dosage de l'aflatoxine M_1 dans les produits laitiers.

Si l'analyse, par cette technique, de la majorité des laits n'a posé que peu de problèmes, quant à l'identification de l'aflatoxine M_1 , il n'en demeure pas moins que, pour certains échantillons, en particulier, ceux correspondant aux fromages affinés, l'identification de la toxine a été rendue délicate par suite de la présence de nombreux composés interférant.

Aussi, avons-nous été contraints, pour ces échantillons, à confirmer la présence d'aflatoxine M_1 par réaction de dérivation à l'acide trifluoracétique (T.F.A.), suivant la méthode de Van Egmond [13], ceci, après séparation par chromatographie en couche mince.

La limite de détection de l'aflatoxine M_1 de cette méthode est de 0,1 ng ce qui, compte tenu des prises d'essai de départ et de la concentration finale de l'extrait, permet de doser entre 20 et 50 ppt*, suivant le type de produits laitiers analysés.

RESULTATS

A partir des 1 046 résultats de dosage de l'aflatoxine M_1 obtenus, ont été déterminées, par calcul et pour chaque type de produits laitiers (lait liquide, poudre de lait, fromage, beurre...) la fréquence moyenne de contamination ainsi que des concentrations moyennes et maximales en aflatoxine M_1 (tab. 1).

Pour les échantillons de lait liquide et de poudre de lait qui ont donné lieu au plus grand nombre d'analyses (602 résultats) nous avons, en plus, représenté les courbes de distribution de la fréquence et du taux de pollution (fig. 3 - 6).

DISCUSSION

L'aflatoxine M_1 a été décelée en teneurs supérieures à 50 ppt dans 430 échantillons sur 1 046, ce qui représente plus de 40 p. 100 d'échantillons pollués.

La fréquence de cette pollution est très différente, suivant le type de produits laitiers concernés ; c'est ainsi que les valeurs les plus élevées sont relevées pour les poudres de lait (58 p. 100), les aliments lactés pour nourrissons (47 p. 100), les laits liquides ; à l'inverse, c'est dans le beurre que la fréquence la plus faible est observée (8 p. 100).

Les concentrations en aflatoxine M_1 des échantillons contaminés, exprimées sur le produit tel quel, vont de 50 ppt à plus de 5 000 ppt,

* 1 ppt = 1 nanogramme/kg.
1 nanogramme = 10^{-9} g.

TABLEAU 1

Fréquence et taux de la contamination par l'aflatoxine M₁ de divers produits laitiers français
 Résultats de 1 046 analyses effectuées du 1^{er} septembre 1980 au 30 juin 1981

Nature du produit	Nombre d'échantillons analysés	Nombre d'échantillons contaminés	Fréquence de la contamination* (p. 100)	Taux moyen de la contamination** ppt (ng/kg)	Taux maximum de la contamination** ppt (ng/kg)
Lait liquide	380	168	44	80	1 150
Poudre de lait	222	129	58	690	5 200
Fromages frais	199	60	30	95	1 450
Fromages affinés	144	42	29	150	2 150
Aliments lactés (nourrissons)	32	15	47	430	4 750
Beurre	26	2	8	N.S.	150
Poudre de lactosérum	22	6	27	115	550
Lait concentré	12	5	40	220	2 250
Crèmes glacées	5	1	N.S.***	N.S.	250
Caséinates	4	2	N.S.	N.S.	350

* Echantillon renfermant plus de 50 ppt d'aflatoxine M₁.

** Exprimé sur le produit tel quel.

*** N.S. = non significatif.

fig. 3

Répartition de la contamination par l'aflatoxine M_1 (concentration) des 380 échantillons de laits liquides analysés.

les teneurs les plus fortes étant relevées dans les poudres de lait, les aliments lactés pour nourrissons, les laits concentrés, c'est-à-dire dans des produits obtenus par concentration du lait liquide. Ainsi, si ces valeurs sont rapportées non plus au produit tel quel mais au produit reconstitué, il peut être observé des concentrations en toxine comparables à celles relevées sur le lait liquide (80 ppt en moyenne).

Les répartitions de la fréquence de pollution et de la concentration en toxine relevées sur les 380 échantillons de lait liquide prélevés sur une période de 10 mois, révèlent des différences très importantes suivant la date à laquelle le prélèvement a été effectué (fig. 5 et 6) ; c'est ainsi que les valeurs les plus élevées sont observées durant les mois allant de décembre à avril et, à l'inverse, c'est durant les mois de mai-juin et de septembre à novembre que les chiffres les plus bas sont notés.

fig. 4

Répartition de la contamination par l'aflatoxine M_1 (concentration) des 222 échantillons de poudre de lait analysés.

Ces différences saisonnières de la contamination du lait sont dues, pour l'essentiel, à la différence d'alimentation des vaches laitières entre la période d'hivernage où elles sont à l'étable et la période estivale où elles se trouvent au pâturage.

C'est, en effet, au cours de l'hiver que le bétail est amené à consommer le plus d'aliments composés dans la formulation desquels peut entrer du tourteau d'arachide, principal vecteur d'aflatoxine B_1 et des fourrages d'hiver (foin, ensilage) sur lesquels le développement d'*Aspergillus flavus* a pu avoir lieu.

CONCLUSION

Au vu des résultats obtenus et, compte tenu de l'état actuel de la réglementation française, il est possible d'indiquer qu'aucun des

fig. 5

Répartition de la fréquence de contamination par l'aflatoxine M₁ de 380 échantillons de lait analysés en fonction de la date de prélèvement

1 046 échantillons de lait et de produits dérivés analysés ne serait aujourd'hui pénalisable. En effet, le seul texte législatif français existant à ce jour sur l'aflatoxine M₁ concerne les aliments diététiques et de régime de l'enfance pour lesquels la dose maximale d'aflatoxine tolérée est de 5 µg/kg, soit 5 000 ppt (arrêté du 1-7-1976 paru au *J.O.* du 14-9-1976).

Par contre, il est vraisemblable que la réglementation sur les aliments des vaches laitières, qui fixe comme taux maximal en aflatoxine B₁ 20 ppb (arrêté du 29-5-1980 paru au *J.O.* du 26-6-80) n'a pas toujours été respectée.

fig. 6

Répartition de la concentration moyenne en aflatoxine M_1 des 380 échantillons de lait liquide analysés en fonction de la date de prélèvement.

En effet, il est actuellement admis que le taux de conversion de l'aflatoxine B_1 ingérée par une vache en lactation, en aflatoxine M_1 éliminée dans son lait est compris entre 0,5 et 3 p. 100 [9, 6], ce qui fait que certains échantillons de lait étudiés par nous, sur lesquels des concentrations élevées en toxine ont été notées (supérieures à 500 ppt) ne peuvent provenir que de vaches ayant consommé des aliments pollués par l'aflatoxine B_1 à un taux supérieur à 20 ppb.

En se référant aux informations évoquées lors d'une séance de travail de l'Association française de normalisation, faisant état de la mise en place d'une réglementation prochaine fixant comme taux maximum d'aflatoxine M_1 dans le lait des valeurs aussi faibles que 50 et 10 ppt, 40 p. 100 des échantillons analysés seraient rejetés en

considérant l'hypothèse où le taux le plus élevé serait retenu (50 ppt).

Un pourcentage beaucoup plus élevé serait éliminé, dans le cas où la valeur de 10 ppt serait retenue.

Ainsi, on est autorisé, légitimement, à se demander s'il est vraiment souhaitable de passer aussi brutalement et rapidement d'une réglementation acceptant jusqu'à 5 000 ppt d'aflatoxine dans les aliments infantiles à une réglementation qui n'en tolérera plus que 50 à 10 ppt.

La fixation de valeurs aussi faibles ne serait d'ailleurs pas sans poser de nombreux problèmes, tant au niveau de l'alimentation des vaches laitières qu'au point de vue analytique.

En ce qui concerne l'alimentation animale, compte tenu du taux de conversion de l'aflatoxine B_1 en aflatoxine M_1 , mentionné précédemment, il sera nécessaire de revoir les réglementations sur les aliments de vaches laitières qui, nous le rappelons, tolèrent aujourd'hui jusqu'à 20 ppb de toxine, ce taux devant, à notre avis, être obligatoirement réduit de 5 à 10 fois pour être en accord avec ce qui sera demandé sur le lait et les produits laitiers.

Des taux aussi faibles dans les aliments des vaches laitières ne pourraient être obtenus qu'en éliminant systématiquement des formulations, des matières premières telles que le tourteau d'arachide dont le taux de contamination même de celui ayant fait l'objet d'une détoxification (le rendement de ce traitement n'est au mieux que de 95 p. 100), risque d'être toujours supérieur au taux admissible, pour que le lait des vaches l'ayant ingéré soit non contaminé.

De plus, l'utilisation d'autres matières premières utilisées couramment en alimentation animale ne sera pas sans poser de problèmes ; en effet, de l'aflatoxine B_1 a déjà été détectée à plus ou moins forte concentration dans des tourteaux de soja, des grains de maïs et dans certains ensilages.

Au niveau analytique, l'application d'une telle réglementation nécessite de disposer d'une méthode de dosage de l'aflatoxine M_1 très sensible pour permettre de détecter des quantités aussi faibles que le dixième ou le vingtième de nanogramme de toxine, tout en restant spécifique et reproductible.

Ce paramètre analytique très important, pour qu'une réglementation puisse être réellement et efficacement appliquée, semble avoir, jusqu'à ce jour, été ignoré ou oublié.

Les différentes méthodes de dosage de l'aflatoxine M_1 qui ont été étudiées et testées jusqu'à ce jour au sein de la Commission Mycotoxines de l'AFNOR* (qui est, à notre avis, l'Organisme le mieux

* AFNOR : Association Française de Normalisation.

placé pour définir et normaliser une méthode de dosage dans ce domaine), ne permettent, au mieux, que de détecter et doser 100 ppt d'aflatoxine M_1 et, ceci, avec un coefficient de reproductibilité compris entre 40 et 60 p. 100 [8, 12].

S'il est vrai que, depuis peu de temps, un certain nombre d'autres méthodes permettant une détection ultra sensible de l'aflatoxine M_1 dans les produits laitiers (0,1 à 1 ppt) ont été décrites dans la littérature [7, 10], aucune n'a, à notre connaissance, fait l'objet d'analyses circulaires qui constituent le seul véritable moyen pour évaluer leur sensibilité et leur reproductibilité.

En conclusion, nous pouvons dire que si la mise en place d'une réglementation fixant des taux limites en aflatoxine M_1 dans les laits et les produits laitiers est une nécessité urgente, il nous semble, par contre, prématuré de retenir les valeurs inférieures à 50 ppt et de l'ordre de 10 ppt qui pouvaient être proposées, compte tenu des problèmes que cela pourrait poser, tant au niveau de la production laitière française qu'au niveau des contrôles analytiques et, dans ce dernier cas, en l'absence d'une méthode officielle reconnue.

Résumé

Les résultats de dosage de l'aflatoxine M_1 effectué sur 1 046 échantillons de lait et produits dérivés, originaires de diverses régions françaises et prélevés durant la période allant du 1^{er} septembre 1980 au 31 juin 1981, ont révélé que plus de 40 p. 100 des échantillons étaient pollués et, ceci, à des concentrations allant de 50 à plus de 5 000 ppt.

La contamination de ces produits laitiers a révélé des différences importantes suivant la nature et l'origine des échantillons analysés ainsi que suivant la date à laquelle les prélèvements ont été effectués.

L'ensemble des résultats obtenus a été comparé, d'une part, à la réglementation française actuelle ; d'autre part, à celle qui doit être en préparation et pour laquelle seraient annoncées des teneurs permises en aflatoxines M_1 très faibles. Les problèmes que pourrait poser la mise en place de cette nouvelle réglementation sont exposés (alimentation animale, problèmes analytiques).

Summary

SOME RESULTS ABOUT THE CONTAMINATION OF MILK AND DAIRY PRODUCTS BY AFLATOXIN M_1 IN FRANCE

The results of Aflatoxin M_1 determinations on 1 046 samples of milk and dairy products, collected from 1st September 1980 to

31st June 1981 in different parts of France, show that more than 40 p. 100 of these samples are spoilt by this toxin in a range of concentration from 50 up to 5 000 ppt.

The amounts of the contamination show big differences according to the king, the origin of the samples, and the date of the sampling.

All the results are compared to the actual french legislation and to the next one which should allow very low amounts of Aflatoxin M₁.

The problems that may appear with this new reglementation are exposed (animal feed, analytical problems).

Reçu pour publication en juillet 1981.

Bibliographie

- [1] ALLCROFT (R.) and CARNAGHAN (R.) (1963). — Groundnut toxicity: an examination for toxin in human food products from animals fed toxic groundnut meal. *Veterinary Record*, 75, 259.
- [2] ALLCROFT (R.) and ROBERTS (B.) (1968). — Toxic groundnut meal : the relationships between B₁ in take by cows and excretion of aflatoxin M₁ in milk. *Veterinary Record*, 82, 116-118.
- [3] ALLCROFT (R.), ROGERS (H.), LEWIS (G.), NABNEY (J.) and BEST (P.) (1966). — Metabolism of aflatoxin in sleep: excretion of the milk toxin. *Nature*, 209, 154-155.
- [4] BLANC (M.) (1980). — Méthode rapide de dosage de l'aflatoxine M₁ dans les produits laitiers. *Revue des Industries Alimentaires et Agricoles*, 97, 893-901.
- [5] DE IONGH (H.), VLES (R.) and VAN PELT (J.) (1964). — Milk of mammals fed an aflatoxin containing diet. *Nature*, 202, 466.
- [6] FRÉMY (J. M.) (1980). — Aflatoxine M₁ et technologie laitière : analyse et évolution de la contamination dans le lait et ses dérivés. Thèse 3^e cycle en Nutrition, présentée le 15-12-80, à Paris VI.
- [7] GAUCH (R.), LENENBERGER (U.) and BAUMGARTNER (E.) (1979). — Rapid and simple determination of aflatoxin M₁ in milk in the low parts per 10¹² range. *J. of Chromatog.*, 178, 543-549.
- [8] KIERMEIER (F.) und MÜCKE (W.) (1973). — Bestimmung von aflatoxin M₁ und M₂ in milch. *Z. Lebens. Unters. Forsch.*, 152, 18-24.
- [9] LAFONT (P.), LAFONT (J.), MOUSSET (S.) et FRAYSSINET (C.) (1980). — Etude de la contamination du lait de vache lors de l'ingestion de faibles quantités d'aflatoxine. *Ann. Nutr. Alim.*, 34, 699-708.
- [10] LAFONT (P.), SRIWARDANA (M.), JACQUET (J.), GAILLARDIN (M.) et SARFATI (J.) (1981). — Méthode de dosage de l'aflatoxine M dans le lait et les produits laitiers. *Le Lait*, 61, 275-281.
- [11] PURCHASE (I.) (1967). — Acute toxicity of aflatoxins M₁ and M₂ in one-day-old ducklings. *Food and Cosmetics toxicology*, 5, 339-342.
- [12] STUBBLEFIELD (R.) (1979). — The rapid determination of aflatoxin M₁ in dairy products. *J. Am. Oil chem. Soc.*, 56, 800-802.
- [13] VAN EGMOND (H.), PAULSCH (W.) and SHULLER (P.) (1978). — Confirmatory test for aflatoxin M₁ in a thin layer plate. *J.A.O.A.C.*, 61, 809-812.