

## COMMUNICATION

---

### **Détection de l'addition frauduleuse de lait de vache dans les laits de chèvre et de brebis par la méthode de l'immunodiffusion en gélose**

par MM. M. DURAND (\*), M. MEUSNIER (\*), J. DELAHAYE (\*\*),  
P. PRUNET (\*)

Note présentée par M. BASILLE

---

Pour l'éleveur ou l'industriel laitier indélicat, la tentation est grande d'ajouter au lait de chèvre, ou de brebis, servant à la fabrication des fromages, du lait de vache dont le prix est souvent 2 fois moindre.

Si donc cette tentation est grande, la fraude est de ce fait relativement fréquente ; celle-ci est d'autant plus facilitée que la mise en évidence de l'addition frauduleuse du lait de vache est malaisée. En effet, il est connu que, si fromages de chèvre, de vache ou de brebis sont fondamentalement différents sur le plan gustatif, néanmoins les laits de ces différentes espèces de ruminants possèdent un certain nombre de constituants communs qui rendent difficile un diagnostic immunologique (identité sérologique de certaines protéines lactées), ou chimique (identité des acides gras par exemple).

---

(\*) Laboratoire Roger Bellon, B. P. Villaines-les-Rochers par Azay-le-Rideau (37190).

(\*\*) I. T. O. V. I. C., 149, rue de Bercy, 75012 Paris Cedex.

Actuellement, la détection de cette fraude est devenue un des problèmes majeurs de l'Industrie fromagère traitant le lait de chèvre. Les récriminations, en effet, fusent de toutes parts : le consommateur de son côté se plaint de déguster parfois des fromages de chèvre qui n'ont de cet animal que celle qui est imprimée sur l'étiquette, d'un autre côté les laiteries, bousculées par le Service de la Répression des fraudes, se déclarent impuissantes à lutter contre cette adulation au niveau de leurs fournisseurs de laits de chèvre, en l'absence d'un test pratique et fiable pour la détection de cette fraude.

C'est ce problème que nous avons tenté de résoudre par la méthode que nous décrivons ci-dessous.

Mais auparavant, nous passerons brièvement en revue les diverses méthodes décrites jusqu'à présent :

#### 1. DIFFÉRENCIATIONS CHIMIQUES OU PHYSICO-CHIMIQUES

Parmi celles-ci, LOPEZ (1934) préconise « l'indice Caprylique » par détermination de l'échantillon en acide Caprylique. Cet indice est fonction de la proportion relative de matière grasse appartenant à chacune des deux espèces animales dans le mélange.

CHOLLET et CAMUS (1938) ont constaté qu'il existait, dans les matières grasses du lait de chèvre et de vache, des différences dans les proportions relatives d'acides volatiles solubles et insolubles. Cependant, ce rapport varie beaucoup dans le cours de la lactation.

KUZDAL (1959) décrit une méthode de dosage du  $\beta$  carotène ; ce pigment, présent dans le seul lait de vache, permet par son dosage de préciser le pourcentage de lait de vache ajouté frauduleusement.

Enfin et surtout, les méthodes d'analyse électrophorétique ont suscité beaucoup de travaux : HILPERT et ENKELMANN (1963), puis ASCHAFFENBURG (1964), ASSENAT (1967) et enfin PORTMANN (1971) ont développé leurs recherches dans le sens de l'électrophorèse des protéines des laits de vache, chèvre, brebis. De leurs observations, il en découle que la caséine  $\alpha$  S du lait de vache a une mobilité électrophorétique plus grande que celle du lait de brebis, elle-même plus grande que celle du lait de chèvre.

De même la  $\beta$  lactoglobuline du lait de vache migre elle aussi plus que les  $\beta$  lactoglobulines des deux autres espèces ; d'où la possibilité, dans un fromage ou dans un lait fraudé, de retrouver à l'électrophorèse différentes bandes après coloration à l'amido SCHWARZ, correspondant aux caséines  $\alpha$  du lait de vache, du lait de brebis, etc... Ces bandes passées au travers de la fente d'un photomètre donnent des pics dont on calcule la surface. On en déduit, selon une formule calculée par PORTMANN, le pourcentage de lait de vache additionné frauduleusement.

Comme on peut s'en rendre compte, toutes ces méthodes sont longues et pas très spécifiques.

## 2. DIFFÉRENCIATIONS IMMUNOLOGIQUES

L'autre voie d'abord dans la détection des adultérations des laits par le lait de vache a été la méthode immunologique. Historiquement, elle est la plus ancienne puisque dès 1899, BORDET montrait que des injections intrapéritonéales de lait au lapin provoquaient l'apparition d'anticorps précipitant la caséine.

LEGROS (1949) détecte l'addition frauduleuse de lait de vache au lait de femme. Enfin, DUTHEIL (1959) proposait à ROQUEFORT une méthode sérologique basée sur ce principe ; de même HADLAND et SOLBERG en 1952 ont publié une méthode voisine : les lapins étaient hyperimmunisés par du lait de vache, puis les anticorps communs laits de vache laits de chèvre étaient saturés par l'addition de lait de chèvre à cet immun-sérum.

En effet, là se trouve le problème, toutes ces réactions ne sont pas spécifiques et tous les auteurs le reconnaissent. Il existe des antigènes communs immunologiquement entre les laits de chèvre et de vache. Cette identité sérologique de certaines protéines aboutit au fait que du sérum anti-lait de vache précipite aussi bien le lait de vache que le lait de chèvre.

Si l'on veut persévérer dans la voie immunologique, deux solutions s'offrent alors au chercheur : soit isoler à l'état pur une protéine spécifique vache et en faire un sérum anti, soit tourner la difficulté et rechercher dans le lait des protéines qui ne sont pas les protéines majeures du lait... c'est cette dernière voie que nous avons choisie.

## DESCRIPTION DU PRINCIPE

a) *Composition protéique du lait :*

Le lait de vache et des autres mammifères présente approximativement la composition suivante :

• Caséines .....	80 p.	100	
• Protéines solubles :			
— immunoglobulines .....	2 p.	100	} 20 p. 100
— $\beta$ lactoglobuline } .....			
— $\alpha$ lactalbumine } .....	15 p.	100	
— protéoses peptones .....	2 p.	100	
— divers .....	1 p.	100	

Au point de vue immunologique, le lait contient donc :

— des protéines de caséines antigéniques et susceptibles de donner des anticorps anticaséines,

— des protéines de protéines solubles antigènes qui donneront elles aussi des anticorps anti-protéines solubles.

b) *Différenciation immunologique de protéines solubles :*

Après des échecs répétés en vue d'avoir des sérums spécifiques anti-lait ou anticaséines, notre travail a porté sur les réactions immunologiques obtenues à partir de protéines solubles. Or, une partie de ces protéines solubles, telles les immunoglobulines sont en réalité le résultat du simple passage de protéines sériques sanguines au travers du Parenchyme mammaire, pour aboutir dans le lait. On a alors recherché parmi ces protéines solubles, les protéines d'origine sérique sanguine ; on a ensuite essayé de mettre en évidence, au niveau de ces protéines, une différence de composition entre les différents laits.

Bien que l'on sache qu'il existe de nombreuses protéines sériques communes entre le bovin, le mouton et la chèvre (DURAND 1962), notre méthode a consisté à ne rechercher dans les laits de vache, brebis ou chèvre, que les seules protéines communes au lait et au sérum sanguin de la vache, puis à éliminer, par addition de sérum sanguin de mouton (fraude vache-brebis) ou de chèvre (fraude vache-chèvre), les protéines communes au mou-

ton-chèvre d'une part, et au bovin d'autre part. Cette détection se fera dans la pratique donc, par un sérum hyperimmun anti-protéines sériques sanguines de vache additionné pour la neutralisation de sérum sanguin de chèvre ou de brebis.

La réaction de recherche de la fraude se fait par la méthode classique d'immunoprécipitation en gélose de OUDIN-OUCHTERLONY.

#### RÉACTION PROPREMENT DITE

On coule dans une boîte de Pétri une quantité suffisante de gélose dont la formule est :

- Agarose B D H ..... 1 g.
- Eau distillée ..... 45 ml
- Solution aqueuse 0,04 p. 100 de bleu  
de Bromothymol ..... 5 ml
- Tampon Véronal — pH 8,3 ..... 50 ml

A l'aide d'un emporte-pièces comportant un tube central et cinq tubes périphériques, on pratique dans la gélose solidifiée 6 réservoirs ; le réservoir central reçoit 0,1 ml du sérum réactif, les réservoirs périphériques reçoivent 0,1 ml de 5 laits à étudier, ou 0,1 cc de laits fraudés en proportion connue. La réaction positive se traduit par l'apparition en 18 à 24 heures d'une ou plusieurs lignes de précipitation nettes à mi-distance entre le lait fraudé et le sérum réactif.

Cette réaction est d'autant plus nette que le pourcentage de lait de vache est plus important (cf. photo n° 1) ; l'intensité de la précipitation va en croissant lorsque l'on passe de 5 à 50 p. 100 de lait de vache.

On peut donc avoir avec de l'habitude, une idée quantitative de l'importance de la fraude dans le lait étudié.

En dessous de 5 p. 100 de fraude, la recherche est plus aléatoire ; à 2,5 p. 100 la ligne est encore visible ; pour des pourcentages inférieurs, elle n'apparaît que si on recharge 2, 3 ou 4 fois de suite le réservoir.

Dans ces conditions, on peut alors très facilement mettre en évidence l'addition frauduleuse de 1 p. 100 de lait de vache.

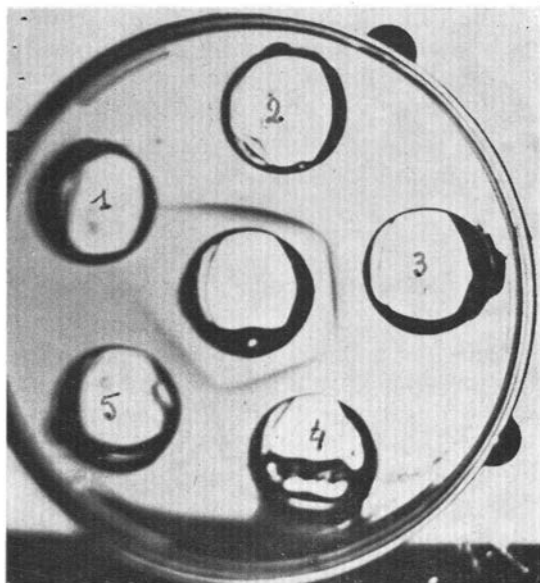


PHOTO N° 1. — Réaction d'immuno-précipitation en gélose vis-à-vis du sérum réactif :

- 1° Lait de chèvre pur. Réaction négative.
- 2° Lait de vache pur. Réaction fortement positive.
- 3° Lait de chèvre fraudé à 25 p. 100.
- 4° Lait de chèvre fraudé à 10 p. 100.
- 5° Lait de chèvre fraudé à 5 p. 100.

En ce qui concerne le nombre de lignes de précipitation, cela dépend de la richesse en lait de vache :

a) Sur le lait de vache pur on observe, une ligne très importante et 2 nettement plus floues qui ont tendance à disparaître en fonction de la dilution du lait de vache vis-à-vis du sérum anti-sérum de bovin.

b) Sur du lait de chèvre pur on n'observe, avec le même sérum, que 2 lignes.

c) Avec le sérum réactif que nous avons mis au point, on observe une ligne nette et parfois une autre ligne à peine visible avec le lait de vache, tandis que l'on ne remarque aucune ligne avec le lait de chèvre (cf. photo n° 2).

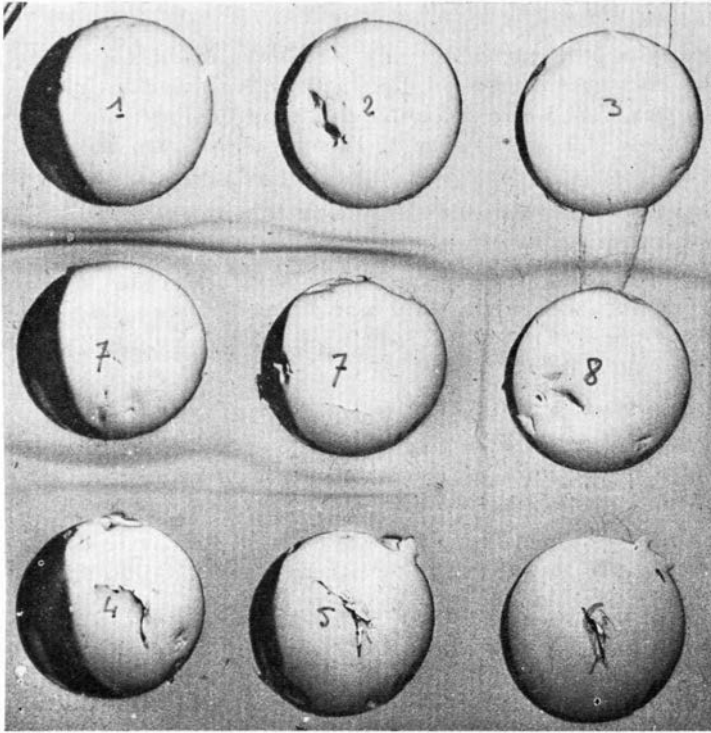


PHOTO N° 2. — Réactions d'immuno-précipitation en gélose entre :

- 1) Lait de vache pur et 7) sérum anti-sérum de bovin : 3 lignes.
- 4) Lait de chèvre pur et 7) sérum anti-sérum de bovin : 2 lignes.
- 2) Lait de vache dilué à 50 p. 100 et 7) sérum anti-sérum de bovin : 2 lignes.
- 5) Lait de chèvre dilué à 50 p. 100 et 7) sérum anti-sérum bovin : 2 lignes.
- 3) Lait de vache dilué à 50 p. 100 dans du lait de chèvre et 8) sérum réactif « Lactotest » : 1 ligne.
- 6) Lait de chèvre pur et 8) sérum « Lactotest » : 0.

#### ETUDE ANALYTIQUE

Nous avons vérifié nos hypothèses en effectuant des immuno-précipitations classiques en gélose et des immuno-électrophorèses sur les divers constituants du lait.

a) *Immunodiffusion double* :

Des laits purs vache, des laits de chèvre fraudés à 10 p. 100 et des laits purs chèvre ont été fractionnés suivant les méthodes classiques, c'est-à-dire précipitation du lait préalablement écrémé à pH acide (4,2 — 4,6) avec de l'acide acétique. On recueille un culot de caséine que l'on lave plusieurs fois avec de l'eau à pH 4,2.

La caséine est remise en solution au volume initial du lait avec de l'eau distillée. Le pH est ajusté à 8,2 avec de la soude 3 N.

Le surnageant de la précipitation acide est remis à pH 6,8 avec de l'Ammoniaque, subit une nouvelle précipitation acide (pH 4,2) ; le surnageant de centrifugation représente les protéines solubles du lait.

Les protéines solubles du lait, comprenant les  $\alpha$  lactalbumines,  $\beta$  lactoglobulines et immunoglobulines, et les caséines sont mises à diffuser en gélose, suivant la technique précédemment décrite en face du *sérum réactif*. Le lendemain on observe :

— sur les 3 laits (lait de vache pur, lait de chèvre et lait de chèvre fraudé : une absence de lignes de précipitation dans tous les cas, en face des caséines de lait ;

— sur ces mêmes laits : des lignes de précipitation aussi nettes que dans le lait de départ, sur les laits de vache et le lait de chèvre fraudé, en face des protéines solubles du lait. On n'observe aucune ligne de précipitation en face des protéines solubles de lait de chèvre.

Il s'agit donc bien d'une réaction de précipitation des protéines solubles.

b) *Immuno-électrophorèse* :

Nous employons la technique classique de l'immuno-électrophorèse ; à l'une des extrémités de la lame sur laquelle on a coulé de la gélose et on fait un petit réservoir, on dépose 0,03 ml de lait de vache ; on fait passer le courant électrique avec une tension (6 volts/cm, 50 minutes épaisseur de la gélose : 1 mm).

2) On réalise le long de la lame et en son milieu une rigole dans laquelle on dépose du sérum anti-sérum de bœuf.

On observe le lendemain : (fig. 3)

— un arc très important et net correspondant aux immuno-globulines ;



— un arc important et flou et un autre à peine visible correspondant aux albumines sériques.

La réaction est la même avec les protéines solubles ; elle ne s'observe pas avec la caséine.

En conclusion, les sérums anti-sérum de bœuf permettent de détecter dans les protéines solubles, 2 à 3 protéines différentes correspondant à des albumines sériques d'une part et des immunoglobulines sériques d'autre part.

β) Sur une autre lame préparée de façon identique, nous déposons le sérum réactif ; on observe le lendemain (fig. 3) :

- un arc important identique au précédent correspondant aux IG ;
- un second arc plus flou correspondant aux albumines.

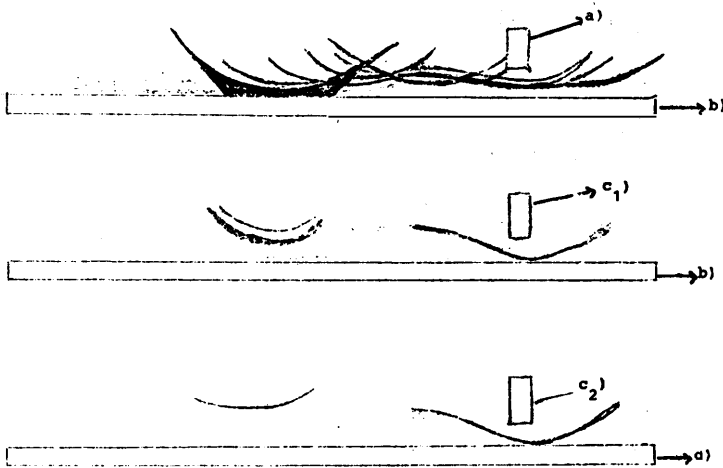


FIG. 3. — *Immunoélectrophorèse*

a) Sérum de bovin (arcs de précipitation correspondant à toutes les protéines sériques).

b) Immun sérum anti-sérum de bovin.

c<sub>1</sub>) Lait de vache (3 lignes de précipitation correspondant aux albumines et aux immunoglobulines).

c<sub>2</sub>) Lait de vache (1 ligne de précipitation IG),

(1 zone de précipitation des albumines).

d) sérum réactif pour la détection du contaminant vache.

## EN CONCLUSION

Au début de nos travaux, nous pensions que le sérum réactif mettait en évidence, une protéine spécifique vache.

Les observations ci-dessus montrent qu'il n'y a pas de différences fondamentales dans les immunoélectrophorèses de lait de vache mises en présence du sérum anti-bœuf ou du sérum réactif.

On ne peut donc pas dire que le traitement par le sérum de chèvre de l'immun-sérum anti-vache révèle une protéine spécifique vache, après avoir fait disparaître les réactions de précipitation pour les protéines communes à la chèvre et à la vache.

Nous émettrions plutôt l'hypothèse que chaque protéine sérique (albumine, globuline) contienne dans le lait au moins deux déterminants antigéniques :

- l'un d'eux est commun à la vache et à la chèvre ;
- l'autre est spécifique de la vache.

De ce fait :

1) Chaque protéine réagirait avec le sérum anti-bœuf classique par le déterminant antigénique commun vache-chèvre et le déterminant spécifique vache ;

2) chaque protéine réagirait avec le sérum réactif par la seule polarité spécifique vache, d'où l'explication de l'absence de précipitation avec le lait de chèvre.

## APPLICATION PRATIQUE

Notre Laboratoire et le Laboratoire Départemental de Tours chargés des analyses de lait pour la région ont contrôlé de nombreux échantillons de laits.

Dans la pratique, il s'agissait en général de laits bichromatés expédiés au laboratoire pour les contrôles habituels de matière grasse.

a) Laits de chèvre : 70 échantillons de laits de chèvre individuels, prélevés à différents stades de la lactation par un contrôleur laitier et provenant de 4 départements (Indre, Cher, Loir-et-Cher, Indre-et-Loire) ont tous donné des résultats négatifs.

b) Laites d'exploitants fournis à la laiterie : notre enquête a porté sur 4 laiteries de la région :

- une laiterie A a donné 5 réactions négatives sur 5.
- une laiterie B a donné 8 réactions négatives sur 8.
- une laiterie C a donné 3 réactions positives sur 30 ; soit 10 p. 100 de fraude.
- une laiterie D a donné 16 réactions positives sur 49 ; soit 28 p. 100 de fraude.

A signaler enfin, que l'allure quantitative de la précipitation nous a permis d'estimer à 10 p. 100 la proportion de lait de vache ajouté frauduleusement chez les fraudeurs de la laiterie C.

Dans la laiterie D, nous avons trouvé la proportion approximative suivante :

- sur 16 fraudeurs :
- 3 ajoutaient à peu près 50 p. 100 de lait de vache au lait de chèvre.
- 6 ajoutaient à peu près 10 p. 100 de lait de vache au lait de chèvre.
- 7 fraudaient dans une proportion inférieure ou égale à 5 p. 100 de lait de vache.

Ainsi donc, après ce premier résultat, on voit que suivant les laiteries, on a des pourcentages de fraudeurs allant de 0 à 30 p. 100 ; ce dernier taux étant considérable. En outre, contrairement à ce que l'on aurait pu s'attendre, rares sont les gros fraudeurs.

On observe plutôt des fournisseurs de lait de chèvre qui font « l'appoint » avec 5 à 10 p. 100 de lait de vache.

En conclusion, notre expérience est assez réconfortante, elle nous montre que la fraude n'est pas installée partout et qu'elle porte sur des additions relativement légères de lait de vache. L'amateur de fromage de chèvre peut d'ores et déjà être rassuré, tout au moins au stade de la laiterie la proportion de lait de vache frauduleusement introduite reste tout compte fait relativement basse. En outre, le sérum diagnostique et le procédé que nous avons mis au point devraient rapidement aboutir, si le test est effectué très régulièrement sur tous les producteurs comme cela se dessine, à une moralisation des fournisseurs de lait de chèvre

et à une garantie quasi absolue du consommateur en ce qui concerne l'appellation pur chèvre ou pur lait de brebis des fromages qu'il trouvera à l'étal des crémiers détaillants.

Il restera cependant un volet de la fraude qui n'a pas été examiné : l'adultération des fromages de chèvre ou de brebis ; à ce niveau la falsification peut être du ressort du fournisseur de lait ou de la laiterie elle-même. Là le problème est plus délicat, en raison de la protéolyse avancée des fromages affinés ; nous espérons néanmoins dans les prochains mois, en collaboration avec les laiteries intéressées apporter aussi une réponse qui ira aussi dans le sens de la défense des intérêts du consommateur également.

#### BIBLIOGRAPHIE

- ASCHAFFENBURG (R.). — *An. Rep. of the Nat. Inst. For Res. in Dairying*, 1964, p. 93.
- ASCHAFFENBURG (R.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 1964, p. 188-191.
- ASSENAT. — *Le Lait*, 1967, p. 393-414.
- CHOLLET (A.), CASMUS (A.). — *Annals Falsif Expertchim*, 1937, 405-410.
- HADLAND (G.), SOLBERG (P.). — XIII<sup>e</sup> Congr. Int. Lait., La Haye, 1953, 1287-1290.
- DURAND (M.). — *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, 1962, 137-160.
- KUZDAL-SAVOIE (S.). — *Annals Falsif. Exp. Chim.*, 1971, 168-177.
- HERRE (A.), PORTMANN. — *Annals Technol. Agric.*, 1970, 107-130 et 177-179.
- HILPERT (H.), ENKELMAN (D.). — *Milch. wissenschaft*, 1963, 18-26.
- BORDET (J.). — *Ann. Inst. Pasteur*, 1899, 13, 225.
- LEGROS (J.). — *Arch. Pédiatrie*, 1949, 4, 561.
- DUTHEIL (H.). — 15<sup>e</sup> Congrès Int. Laiterie, Londres, 1959, 3, 1522.

---

Le Gérant : C. BRESSOU