

DÉVELOPPEMENT DE SYSTÈMES ANALYTIQUES
POUR LE CONTRÔLE DE L'AUTHENTICITÉ DES VIANDES CERTIFIÉES



O. Fumière CRA

**Développement de systèmes analytiques
pour le contrôle de l'authenticité des viandes certifiées**

Projet NP/42/022

**Ministère des Classes Moyennes et de l'Agriculture - Centre de Recherches
Agronomiques de Gembloux
Département Qualité des Productions Agricoles
24, Chaussée de Namur 5030 Gembloux**

Introduction

Les attentes des consommateurs en matière de qualité des aliments peuvent se résumer par : Satisfaction, Service, Sécurité et Santé. La sécurité et la santé constituent les éléments d'une qualité de base des produits alimentaires. A cet égard, des normes sont strictement définies par les législations communautaires et/ou nationales. Ces deux critères ont cependant pris avec les événements récents qui ont touché le secteur de la viande (hormones, ESB, dioxines) une ampleur particulière auprès de la grande majorité des consommateurs. La population a désormais pris conscience des enjeux liés à la sécurité alimentaire et ce critère est de plus en plus assimilé à un facteur de particularité.

Parallèlement à ces réactions de crainte et de méfiance des consommateurs, les produits alimentaires porteurs de signes distinctifs de qualité (labels, appellations d'origine et identifications géographiques, produits issus de l'agriculture biologique et de la production intégrée) se sont largement développés. Par différents aspects, ils répondent aux nouvelles attentes exprimées par les consommateurs et s'inscrivent dans le développement d'une agriculture durable. Des législations de protection de ces filières ont également été élaborées et mises en place ; elles sont parfois accompagnées de mesures financières d'aide.

Les produits de qualité particulière connaissent donc un essor important. L'authenticité de ces produits vendus plus chers et présents sur un marché de plus en plus international est devenue une préoccupation à la fois des autorités, en raison des pertes potentielles de revenus occasionnées en cas de fraude, mais également pour les producteurs honnêtes, qui pâtissent des pratiques déloyales de leurs concurrents et pour le consommateur, qui n'est pas sûr de retrouver dans son assiette un produit à la hauteur de ses attentes.

Lors de l'inventaire des produits agricoles et agro-alimentaires attestant des qualités spécifiques qui a précédé ce projet¹, la diversité des signes distinctifs existants avait été mise en évidence.

Leur authentification se réfère à des aspects tels que :

- la présence d'ingrédients définis en proportions définies ou leur absence ;
- le respect d'un mode de production, transformation, conservation ;
- l'origine géographique ;
- l'origine génétique.

Des différences de niveaux de garantie apportées par les systèmes de certification avaient été soulignées. Il ressortait clairement des conclusions de cet inventaire¹ que les techniques permettant de contrôler la conformité des produits soumis à une certification pouvaient dans certains cas être insuffisantes et que la crédibilité de ces produits pourrait être remise en cause. Des problèmes importants en matière de contrôle analytique (détection des hormones, détection des antibiotiques, détection des farines animales, problèmes de traçabilité, ...) avaient notamment été relevés.

La mise au point de nouvelles méthodes d'analyses est indispensable et doit permettre de mieux contrôler la conformité des produits aux normes complémentaires

¹ Projet de recherche NP/DD/05 – contrat NP/42/005 : Contrôle de l'authenticité des produits agricoles et agro-alimentaires attestant des qualités spécifiques

dictées dans le cadre des productions de qualité certifiée. En ce sens, le projet répond à la demande des organismes certificateurs chargés de ces contrôles.

Parmi les produits certifiés de qualité spécifique, nous avons choisi de focaliser nos recherches sur le secteur de la viande et en particulier sur la filière « poulet de chair ». Ce choix se justifie par l'importance qu'a pris la viande de volaille dans la consommation des ménages au cours de ces dernières années, par l'impact environnemental que peut avoir cette production et par la multiplication des labels et mentions observées dans ce secteur.

Objectifs du projet et résultats obtenus

Le but du projet est de développer des outils **analytiques** destinés aux organismes de contrôle et de certification afin d'améliorer la fiabilité de l'authentification des produits certifiés, de répondre à la demande des organismes de contrôle belges et d'en faire bénéficier les filières de produits animaux de qualité certifiée en Europe.

Le concept d'authentification de produits certifiés consiste en un système analytique de contrôle de la conformité des **produits finaux** et des **matières premières** à des normes de qualité particulière définies dans un cahier des charges.

Dans le cas présent du poulet de chair, nos efforts se sont portés sur le contrôle **des viandes** et **de l'alimentation** des poulets.

1. Collecte des échantillons

Cent quarante huit poulets et 9 découpes (4 cuisses et 5 blancs) ont été utilisés dans le cadre de ce projet. Ils ont été obtenus par l'intermédiaire du Professeur André Théwis (UNITÉ DE ZOOTECHNIE de la FACULTÉ UNIVERSITAIRE DES SCIENCES AGRONOMIQUES de Gembloux; membre de l'Union Professionnels des Producteurs de Volailles sous Label – UNIPROVOLA; Président de la FILIÈRE AVICOLE WALLONNE) ou achetés dans le commerce. Nous nous sommes attachés à couvrir au mieux l'ensemble des produits commercialisés en nous approvisionnant dans les différentes chaînes de grandes surfaces existantes en Belgique (Champion-Groupe Mestdagh, Delhaize, AD Delhaize, Maxi GB, GB Partners, Match et Nopri).

Le projet initial avait pour objectif la mise au point de méthodes analytiques de contrôle permettant de distinguer les découpes de poulets et produits de viandes de poulets issus de productions certifiées quelles qu'elles soient; un inventaire de produits commercialisés nous a permis de prendre conscience de la diversité des labels, mentions et signes distinctifs existant dans le secteur. La multiplicité des informations présentes sur l'étiquette est parfois la source de confusion pour le consommateur. Différentes études (Touraille *et al.*, 1981 et 1985; Culioli *et al.*, 1990; Rabot *et al.*, 1996 et 1999 a et b) ont analysé les facteurs susceptibles d'influencer la qualité de la viande de poulet. Le principal facteur conduisant à une qualité **organoleptique** sensiblement différente est un âge d'abattage proche de la maturité sexuelle. Un âge d'abattage de 81 jours semble un bon compromis car il est postérieur à la puberté mais évite que la viande ne devienne trop ferme (Sauveur, 1997). Ce paramètre implique l'utilisation de souches à croissance lente pour les productions « labels ». **Il nous est donc apparu plus cohérent d'établir la distinction entre les souches à croissance lente utilisées spécifiquement dans les productions certifiées (Label Rouge et Label de Qualité Wallon) et les souches à croissance rapide employées dans les systèmes de production intensive.**

Une classification sur cette base peut heurter car elle est jugée par certains comme confuse. Elle introduit en effet une différence entre les labels (Label Rouge et Label de Qualité Wallon) et d'autres mentions également soumises à une certification (par exemple : « Alimenté avec ...% de... », « Elevé à l'intérieur - système extensif »). Si ces dernières apportent des garanties aux consommateurs en matière de sécurité alimentaire (absence de promoteurs de croissance (antibiotiques), de farines et de graisses animales dans l'alimentation des poulets) et de bien-être des animaux (densité de population limitée), elles ne conduisent pas systématiquement à un produit final sensiblement différent des productions intensives. Il est donc très difficile de les distinguer sur base de leur composition (leur âge d'abattage est antérieur à la maturité sexuelle et la composition de leur viande est proche de celle des poulets industriels) ou

de leurs origines génétiques (utilisation de souches à croissance rapide comme en production intensive).

Deux groupes ont donc été constitués :

Le groupe des poulets de chair issus de souches à croissance lente est constitué de 74 individus appartenant à des souches caractérisées par une faible vitesse de croissance. L'âge d'abattage est généralement compris entre 81 et 91 jours. Ils sont élevés en respectant un cahier des charges dont les contraintes majeures sont :

- l'utilisation d'une alimentation de faible densité énergétique :
 - pas d'ajout de graisses ni de protéines d'origine animale,
 - absence de promoteur de croissance (antibiotiques).
- une faible densité d'animaux au sol et l'accès à un parcours extérieur.

Ils étaient tous porteurs d'un signe distinctif (Label Rouge ou Label de Qualité Wallon) et avaient fait l'objet d'un contrôle par un organisme certificateur agréé.

Le groupe des poulets de chair à croissance rapide est constitué de 74 individus élevés selon des systèmes de production intensifs et de 9 découpes. L'âge d'abattage est, d'après les références bibliographiques, généralement de l'ordre de 42 jours voire moins. Les animaux reçoivent une alimentation à haute densité énergétique. L'utilisation de facteurs de croissance autorisés conformément à la législation est souvent pratiquée. La forte densité d'animaux et l'absence de parcours extérieur sont également caractéristiques de ce type de productions intensives.

Dans ce second groupe, 17 poulets font l'objet d'une certification de conformité. Celle-ci a généralement pour objet de garantir aux consommateurs l'absence de farines animales et d'antibiotiques dans l'alimentation. Ces poulets présentent des caractéristiques qui les rapprochent tantôt des poulets à croissance lente tantôt des poulets à croissance rapide. Les mentions dont ils sont porteurs répondent au règlement CEE 1538/91 et à ses modifications fixant les normes de commercialisation de la viande de volailles.

2. Authentification de découpes de viandes par spectrométrie dans le proche infrarouge (SPIR)

Développement de modèles de discrimination distinguant les poulets à croissance lente des poulets à croissance rapide

Si les caractéristiques morphologiques permettent une identification relativement aisée des carcasses entières de poulets certifiés de souches à croissance lente par rapport aux poulets industriels, il n'en va pas de même pour les découpes ou les viandes transformées. Toutefois, les caractéristiques intrinsèques et organoleptiques propres aux poulets de productions certifiées sont nettement différenciées et pourraient être identifiées par la SPIR.

L'analyse des échantillons de viande de poulet par spectrométrie dans le proche infrarouge a été réalisée au moyen de deux spectromètres : le **NIRSystems 6500** (FOSS-NIRSYSTEMS INC., Silver Spring, USA) et le **Perten DA 7000** (PERTEN INSTRUMENTS INC., Chatham, USA). Ces deux appareils possèdent des caractéristiques complémentaires. Outre l'évaluation du potentiel de la spectrométrie dans le proche infrarouge pour reconnaître et distinguer les viandes de poulets issus de souches à croissance lente, les performances respectives de ces deux spectromètres ont également pu être comparées. Pour chacun des deux appareils, il a été nécessaire de déterminer le meilleur mode de présentation de l'échantillon.

Un protocole a été mis au point afin de pouvoir analyser les échantillons sur les deux spectrophotomètres utilisés et d'obtenir des spectres reproductibles. Les modèles de discrimination ont été développés en faisant varier les paramètres de traitements des spectres. L'ensemble de la démarche adoptée est décrite en détail dans l'article « Attempted authentication of cut pieces of chicken meat from certified production using near infrared spectroscopy » (Fumière *et al.*, 2000).

Des modèles de discrimination ont été développés pour les échantillons de cuisses avec peau, de blancs sans peau, de carcasses avec peau (produits présents dans le commerce) et de peaux.

Les résultats obtenus appellent les commentaires suivants :

- Les performances des modèles obtenus avec le NIRS 6500 sont toujours supérieures aux performances des modèles obtenus avec le Perten DA 7000. Ceci est probablement dû aux caractéristiques mêmes des instruments (gammes de longueurs d'onde et résolutions) ainsi qu'à la préparation des échantillons (découpes entières pour le Perten DA 7000 – viandes hachées pour le NIRSystems 6500).
- Les performances obtenues se situent généralement entre 85 % et 100 % de classifications correctes. Dans de nombreux cas, plus de 90 % des individus sont correctement classés.
- Les performances des modèles obtenus avec les blancs sans peau sont légèrement inférieures à celles obtenues avec les autres types d'échantillons. Les pourcentages d'affectations correctes se situent entre 80 – 85 % avec le Perten DA 7000.
- Les résultats obtenus avec les échantillons de peau sont comparables à ceux des autres types d'échantillons à l'exception des poulets à croissance lente qui montrent un taux d'affectations correctes plus faible.

Les résultats décrits ci-dessus sont obtenus en utilisant une règle de classification selon deux groupes (les poulets à croissance lente vs. poulets à croissance rapide). Dans le groupe des poulets industriels, nous avons repris 17 poulets faisant l'objet d'une certification de conformité. Il serait intéressant de pouvoir distinguer ces poulets certifiés des poulets industriels. Concrètement et sans remettre en cause l'originalité de ces produits que nous appellerons de qualité intermédiaire, il semble cependant difficile, au moyen de la spectrométrie dans le proche infrarouge, de les distinguer des poulets industriels.

Influence des interactions génotype x alimentation sur les spectres infrarouges de découpes de poulets standards et labels

L'utilisation en routine des modèles infrarouge de discrimination développés implique qu'ils soient capables de mettre en évidence des fraudes (par exemple au niveau de l'alimentation).

L'incidence des conditions d'élevage et de l'alimentation sur les performances, le comportement et la composition de la carcasse de deux génotypes de poulets, l'un à croissance rapide, l'autre à croissance lente, a été étudiée précédemment (Lewis *et al.*, 1997). Par ailleurs, Girard *et al.* (1993) ont pu discriminer deux populations, l'une de poulets « label fermier », l'autre de poulets « standard », par l'analyse de la composition en lipides des viandes.

Une expérimentation animale a été menée au sein de l'UNITÉ DE ZOOTECHNIE du Professeur André Théwis (FACULTÉ UNIVERSITAIRE DES SCIENCES AGRONOMIQUES DE GEMBLoux) afin de voir dans quelle mesure les niveaux énergétiques et protéiques de l'aliment influencent les spectres infrarouge de découpes de poulets issus de souches à croissance lente ou rapide et de contrôler ainsi l'authenticité d'un des aspects du système de production de poulets « label fermier ».

Quatre groupes de 7 poulets ont été constitués : 2 groupes témoins (poulets à croissance lente nourris avec un aliment « label » et poulets à croissance rapide nourris avec un aliment « standard ») et 2 groupes faisant l'objet d'une fraude au niveau de l'alimentation des animaux (poulets à croissance lente nourris avec un aliment « standard » et poulets à croissance rapide nourris avec un aliment « label »). L'avantage économique que pourraient apporter ces deux types de fraude réside essentiellement dans le raccourcissement de la période nécessaire pour atteindre le poids d'abattage.

Les modèles de discrimination développés sur base du spectre dans le proche infrarouge de la viande ont été utilisés pour prédire le groupe auquel est affecté chaque échantillon : le groupe des poulets à croissance lente ou le groupe des poulets

à croissance rapide. Pour cette expérimentation, 3 types d'échantillons ont été analysés : les cuisses avec peau, les blancs sans peau et les carcasses avec peau.

Les échantillons des poulets appartenant aux groupes témoins sont pratiquement tous correctement classés quel que soit le type d'échantillon et l'appareil utilisé (1 échantillon de blanc mesuré avec le Perten DA 7000 a été mal classé).

Les échantillons des poulets appartenant aux groupes « frauduleux » sont majoritairement classés comme appartenant au groupe des poulets à croissance rapide (en moyenne > 75 % des échantillons). Cette observation est particulièrement vraie pour les poulets à croissance rapide nourris avec l'aliment label (> 90 % des échantillons).

Les résultats obtenus lors de cette expérimentation montrent que les modèles de discrimination développés sur base du spectre dans le proche infrarouge de la viande pourraient détecter quelque 75 % des fraudes (poulets élevés dans des conditions ne respectant pas le cahier des charges imposant l'utilisation de souches à croissance lente **et** une alimentation spécifique) et les identifieraient comme des poulets à croissance rapide.

Analyse de la matière grasse présente dans la viande de poulet

Un des paramètres pouvant expliquer les différences spectrales observées entre les échantillons de viandes provenant de poulets à croissance lente ou rapide est leur richesse en lipides. Des différences quantitatives et qualitatives ont déjà été observées par Cozzolino *et al.* (1996) et par Girard *et al.* (1993).

Une étude de la matière grasse contenue dans les échantillons analysés par spectrométrie dans le proche infrarouge a donc été réalisée. Le dosage de la matière grasse totale et l'analyse de sa composition en acides gras ont été effectués sur un nombre limité d'échantillons.

Pour la matière grasse totale, une équation de calibration a été développée. Celle-ci a permis de prédire la teneur en matière grasse totale de l'ensemble des échantillons mesurés par spectrométrie dans le proche infrarouge pour le développement de modèles de discrimination.

Les résultats obtenus confirment ce qui est décrit dans la littérature. Les poulets issus de souches à croissance lente utilisés dans les productions labellisées présentent globalement des teneurs en matière grasse plus faibles que les poulets issus de souches à croissance rapide élevés dans les systèmes de production intensifs.

Remarquons que les poulets élevés dans des systèmes de production se pliant à des exigences alimentaires particulières (poulets avec certification de conformité) présentent des teneurs en matière grasse couvrant les mêmes gammes que celles des poulets à croissance rapide. Ces résultats confirment la similitude des deux types de produits.

La même équation de calibration a été utilisée pour prédire les teneurs en matière grasse totale des échantillons obtenus dans le cadre de l'expérimentation animale menée par l'Unité de Zootechnie.

En règle générale, les individus appartenant aux deux groupes témoins (poulets à croissance lente nourris avec un aliment label et poulets à croissance rapide nourris avec un aliment standard) se comportent bien comme les poulets du commerce (faibles teneurs en matière grasse pour les poulets à croissance lente et teneurs élevées pour les poulets à croissance rapide).

Les poulets provenant des deux groupes dits « frauduleux » (poulets à croissance lente nourris avec un aliment standard et poulets à croissance rapide nourris avec un aliment label) présentent des teneurs en matière grasse intermédiaires. Pour les échantillons de cuisses et de blancs, les poulets à croissance rapide nourris avec l'aliment label présentent des teneurs en matière grasse inférieures à celles des poulets à croissance lente nourris avec l'aliment industriel. Pour les échantillons de carcasses, on observe la situation inverse.

En conclusion, l'alimentation a clairement un effet sur la teneur en matière grasse de la viande. Le type de souche semble également jouer un rôle : les poulets à croissance lente sont, pour une même alimentation, moins gras que les poulets à croissance rapide.

Il est à noter qu'un régime alimentaire plus énergétique a permis d'atteindre le poids commercial 11 jours plus tôt pour les poulets à croissance lente (79 jours avec l'aliment label contre 68 jours avec l'aliment standard) et de gagner 7 jours pour les poulets à croissance rapide (51 jours avec l'aliment label contre 44 jours avec l'aliment standard).

3. Authentification de l'origine génétique des produits de viande et du type de souche de poulets

Détection et identification génétique des espèces animales présentes dans des préparations carnées

Un des résultats auxquels le projet a abouti est de montrer que la PCR-RFLP bien que préconisée pour déceler des mélanges de viandes (Meyer *et al.*, 1995 ; Zimmerman *et al.*, 1998) n'est absolument pas appropriée pour un tel usage. En effet, si le recours à des amorces universelles présente bien l'avantage théorique de ne pas nécessiter des idées préconçues sur les éventuels constituants du mélange, il s'est avéré que cette technique engendre un biais évident dans la détection des espèces du mélange. Ainsi, dans un mélange de viandes dinde/poulet qui est sans doute l'une des fraudes les plus plausibles, il est apparu qu'au moyen de la technique PCR-RFLP une teneur de 10% en dinde est indétectable. On ne commence à déceler sa présence qu'à partir de 25%. Cela s'explique par le fait que les amorces considérées comme universelles amplifient préférentiellement le poulet.

Ce phénomène de biais a également été pointé par Behrens *et al.* (1999) qui pour l'éviter préconisent le recours à des cibles univoques pour chaque espèce animale telles que celles mises en œuvre dans les trousseaux ALCUM. Les "kits" de détection de la dinde par PCR de la firme ALCUM (ALCUM GmbH, Rietberg-Neuenkirchen, Allemagne) ont été employés sur des mélanges de viandes dinde/poulet et, cette fois, même de faibles teneurs en viande de dinde (0,1%) étaient encore décelables dans un mélange dinde/poulet. Dans le cadre d'un travail réalisé par un stagiaire au sein du Département Qualité des Productions Agricoles, il a par ailleurs pu être montré que les "kits" de la firme Alcum se fondent sur des cibles issues du gène du cytochrome *b*. Les segments univoques pour la reconnaissance du bœuf, du porc, de la dinde et du poulet de ces "kits" ont été clonés et séquencés. Il a, de plus, pu être montré que ces cibles demeurent discernables dans des produits ayant subis un traitement drastique puisque leur détection est possible même sur des farines de viande.

Recherche de déterminants moléculaires permettant de caractériser des souches de poulets à croissance lente

Pour arriver à trouver des déterminants moléculaires typiques de poulets à croissance lente, il faut arriver à déceler des polymorphismes corrélés à la vitesse de croissance au sein d'empreintes génétiques obtenues par l'une ou l'autre technique de criblage du génome. Les possibilités techniques pour produire de telles empreintes sont nombreuses : PCR-RFLP, RAPD, AFLP, microsatellites, ...

La voie principale que nous avons utilisée est la technique de l'AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism ou Polymorphisme de Longueur de Fragment Amplifié) décrite par Vos *et al.* (1995). Ce choix est fondé sur le fait qu'elle ne requiert aucune connaissance préalable du génome à analyser, tout en étant bien reproductible quel que soit l'appareillage utilisé (ce qui n'est pas le cas de la RAPD). Toutefois, l'inconvénient de l'AFLP est de ne pas permettre d'orienter les recherches vers un objectif précis, dans notre cas un polymorphisme lié à la vitesse de croissance. La découverte d'un polymorphisme valable est en définitive un événement purement fortuit car résultant d'une démarche par tâtonnements avec de multiples combinaisons d'amorces qu'aucune logique ne peut sous-tendre.

La technique de l'AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) est basée sur l'amplification sélective par PCR (Polymerase Chain Reaction) de fragments de restriction provenant de la digestion complète d'ADN génomique.

Les combinaisons d'enzymes de restriction et d'amorces sélectives qu'autorise l'AFLP sont pratiquement illimitées. **Deux couples d'enzymes ont été retenus** : **EcoRI/MseI** est le couple d'enzymes classiquement repris pour décrire la technique et le plus couramment utilisé. Par ailleurs, la combinaison d'enzymes de restriction **EcoRI/TaqI** semble bien adaptée au cas des mammifères et des oiseaux en général et du poulet en particulier (Knorr *et al.*, 1999). 99 couples d'amorces ont été testés sur les ADN digérés par **EcoRI/MseI** ; 22 combinaisons d'amorces ont été testées sur le matériel génomique restreint par **EcoRI/TaqI**.

Les tests ont dans un premier temps été réalisés avec un nombre d'individus restreint. Les combinaisons intéressantes (présence d'une ou de plusieurs bandes de manière exclusive dans l'un des groupes de poulets) ont ensuite été testées sur un échantillonnage plus étendu. Deux combinaisons ont finalement été testées sur l'ensemble de la population à notre disposition. Elles permettent la mise en évidence d'une bande spécifique des poulets à croissance lente (333 pb) dans un cas et d'une bande caractéristique des poulets à croissance rapide (372 pb) pour la seconde combinaison. Ces deux bandes ont été isolées, clonées et séquencées. Aucune homologie n'a été établie avec des séquences connues qui auraient pu être indicatrices d'un lien direct avec la croissance (comparaison avec les séquences actuellement répertoriées dans les banques de séquences internationales).

4. Contrôle de l'absence d'antibiotique dans les aliments

Les prescriptions rencontrées dans les cahiers des charges des productions certifiées imposent l'absence totale d'alimentation antibio-complémentée. Les méthodes de détection actuellement mises en œuvre lors des contrôles ne permettent pas de déterminer la nature exacte de l'inhibiteur rencontré lors d'un résultat positif.

De nouvelles méthodes analytiques de type chromatographique sont actuellement de plus en plus développées. Cependant, la plupart de ces protocoles sont mis au point pour vérifier la teneur annoncée pour un antibiotique dans un aliment ou dans un prémix (Cutting *et al.*, 1997) et ne correspondent donc pas à l'analyse d'un résultat positif.

L'application des tests microbiologiques pour la détection des antibiotiques dans les aliments a confirmé la présence d'un pouvoir inhibiteur pour de nombreuses matières premières ne contenant a priori aucun antibiotique. Ces méthodes, si elles présentent l'avantage d'être facilement mises en œuvre pour un coût modique, demandent que leurs résultats soient confirmés par une méthode analytique. Il est en effet illusoire de rechercher un antibiotique dans un aliment contenant une forte concentration en sels minéraux, ceux-ci inhibant par leur seule présence les souches tests utilisées.

D'un point de vue microbiologique, nous cherchons à développer un test basé sur la croissance d'un organisme bactérien de référence, *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*, déjà utilisé pour la détection des antibiotiques dans le lait, dans un milieu liquide. Un indicateur de pH, le pourpre de bromocrésol, ajouté au milieu nous permet de suivre l'évolution de la croissance bactérienne, laquelle est directement liée à la présence ou à l'absence de substances inhibitrices. Le suivi de l'acidification se fait par lecture optique de manière à objectiver l'interprétation des résultats.

Nous sommes cependant confrontés, lors de la réalisation d'extraits (aqueux et alcoolique) à partir de matières premières, à des résultats faux positifs. Le pH et le pouvoir tampon des extraits obtenus sont deux paramètres fondamentaux dans un test basé sur une acidification : un pH trop élevé entraîne un retard dans l'acidification, un pH inférieur à 5.2 donnera un résultat systématiquement négatif, un extrait à fort pouvoir tampon pourra donner un résultat positif. L'importance de ces paramètres a été mise en évidence en corrigeant notamment le pH d'extrait présentant une zone d'inhibition, celle-ci disparaissant après neutralisation d'un pH acide.

Si la forme sous laquelle les matières premières sont présentées est importante, leur contamination bactérienne semble tout aussi fondamentale : nous avons isolé et identifié (BCCM™/LMG – Gent-Belgique) six souches bactériennes produisant ou susceptibles de produire un pouvoir inhibiteur. Nous nous sommes attachés à vérifier la présence de bacitracine, antibiotique polypeptidique utilisé comme additif alimentaire et promoteur de croissance, produit industriellement à partir d'une souche

de *Bacillus licheniformis*. Nos analyses chromatographiques, effectuées sur la souche de *Bacillus licheniformis* isolée à partir de céréales, indiquent que la bacitracine n'est pas l'agent responsable des réponses positives.

D'autre part, à côté de cet aspect « interférences microbiologiques », nous avons transféré une méthode de détection des sulfamides dans le lait vers les aliments. En effet, les sulfamides sont utilisés à grande échelle dans l'élevage de volailles comme coccidiostatiques, notamment. Leur présence peut être mise en évidence par test microbiologique (inhibition bactérienne), les teneurs généralement présentes dans les aliments étant facilement décelables. Cette méthode chromatographique (HPLC) est basée sur la réaction de l'amine primaire portée par les sulfamides avec la fluorescamine pour donner un composé fluorescent facilement détecté et dosé. L'extraction de sulfamides à partir d'aliment dopé a montré le potentiel de cette méthode. Cette dernière a par ailleurs été comparée à la méthode utilisée en routine dans les laboratoires de contrôle sur des échantillons d'aliment de commerce (en collaboration avec Monsieur Fontaine, du LABORATOIRE DE L'ETAT DE TERVUEREN). Cette comparaison a permis de mettre en évidence des interférences pour les pics obtenus lors de l'analyse chromatographique effectuée selon la méthode de routine, contrairement aux pics obtenus lors de l'analyse selon la méthode « fluorescence ». Ces interférences, présentes en détection UV, sont résolues lors de l'analyse par fluorescence, les composés interférents n'étant manifestement pas réactionnels avec la fluorescamine. Cet aspect de la recherche a été mené dans le cadre d'un travail de fin d'études réalisé à la Faculté des Sciences agronomiques de Gembloux, service du Professeur Marlier (UNITÉ DE CHIMIE GÉNÉRALE ET ORGANIQUE), en collaboration avec Monsieur G. Lognay.

D'une grande sensibilité par rapport aux concentrations à déceler, cette méthode reste cependant une méthode de confirmation qu'il est impensable d'appliquer en routine sur tous les échantillons contrôlés. Elle doit donc s'inscrire dans le cadre de système intégré de détection des résidus inhibiteurs comprenant une première étape de sélection microbiologique et une seconde étape de confirmation analytique.

5. Détection de farine de viande par microscopie NIR

La proposition initiale visait la mise au point d'un système analytique permettant de discriminer les aliments certifiés des ordinaires et le contrôle de l'absence de protéines et de graisses d'origine animale. Les difficultés rencontrées pour obtenir une gamme suffisamment complète d'aliments nous ont conduit à concentrer nos efforts sur la détection des particules d'origine animale. Actuellement, bien qu'elle soit laborieuse et requiert un manipulateur expérimenté, la microscopie optique est la méthode de référence pour ce type d'analyse. Une technique alternative pourrait être la microscopie NIR. Le microscope-NIR permet de prendre le spectre infrarouge d'une seule particule provenant d'un échantillon de farine. Succinctement, au niveau du microscope, une caméra vidéo permet de visualiser l'échantillon et de localiser au sein de celui-ci la particule à analyser. Un rayon infrarouge est ensuite dirigé sur la particule et un détecteur situé dans le microscope permet d'enregistrer son spectre infrarouge.

L'objectif poursuivi est de détecter la présence de particules d'origine animale (os, viandes) interdites dans les formulations d'alimentaires destinées aux productions certifiées. Le nombre de matières premières différentes entrant dans la fabrication d'aliments pour animaux est particulièrement élevé (on estime le nombre de références à +/- 700). La principale difficulté est donc de réaliser des bibliothèques de spectres de particules qui soient complètes.

La démarche qui a été envisagée est divisée en 3 étapes :

- 1°) Réaliser des bibliothèques de spectres de matières premières ;
- 2°) prendre le spectre d'une particule dans un aliment et le comparer aux bibliothèques ;
- 3°) identifier la particule en assignant le spectre à une bibliothèque.

Sur base des bibliothèques des spectres réalisées avec les échantillons à notre disposition, des règles de discrimination ont été développées pour distinguer les particules provenant de matières premières autorisées ou interdites. Les résultats de

l'analyse discriminante montrent qu'il est possible de détecter des particules de viande et d'os dans un aliment composé broyé avec un taux de réussite supérieur à 95 %.

Il faut noter que plus la proportion de ces particules interdites est faible, plus le nombre de particules à analyser est élevé pour maintenir une probabilité de détection élevée. Ainsi, par exemple, si un aliment contient 2 % de farine de viande et d'os et que l'on veut observer au moins une particule de viande ou d'os avec une probabilité de 95 %, il faut analyser environ 250 particules. Si un aliment contient 0.5 % de farine de viande et d'os et que l'on veut observer au moins une particule de viande et d'os avec une probabilité de 95 %, il faut analyser environ 1000 particules. L'analyse des particules se faisant une par une, l'analyse d'un tel nombre de particules allonge considérablement la durée totale de l'analyse.

Perspectives

Optimisation des modèles de discrimination distinguant les poulets à croissance lente des poulets à croissance rapide sur base du spectre dans le proche infrarouge de leur viande

Nous avons pu démontrer le potentiel de la spectrométrie dans le proche infrarouge (SPIR) pour distinguer les poulets issus de souches à croissance lente des poulets à croissance rapide. Les modèles de discrimination que nous avons développés reposent sur des mesures effectuées sur une population conséquente mais encore limitée pour en tirer des conclusions définitives.

Il serait intéressant d'étendre nos mesures à de nouveaux individus, de tester de nouveaux algorithmes permettant de distinguer les deux populations et de comparer les résultats obtenus avec les performances de nos modèles actuels. Notre objectif est d'optimiser les performances de la technique afin de permettre son utilisation en routine.

Recherche de déterminants moléculaires permettant de caractériser génétiquement des souches de poulet à croissance lente

Les recherches menées lors de ce projet ont porté sur des échantillons provenant du commerce. Les informations concernant la génétique de ces poulets sont inaccessibles car tenues confidentielles par les firmes de sélection. Toutefois, nous envisageons de tester les déterminants sur des poulets de races, souches et lignées parfaitement définies et ainsi d'y voir quelle est la « prévalence » des déterminants identifiés.

Le choix de l'AFLP comme technique d'investigation du polymorphisme de l'ADN se justifiait par le fait qu'elle ne nécessite aucune connaissance préalable du génome tout en étant reproductible. Les résultats obtenus jusqu'à présent nous permettent d'envisager avec optimisme la distinction entre les souches de poulets à croissance lente et les souches de poulets à croissance rapide sur base de déterminants moléculaires. L'AFLP apparaît cependant comme une technique d'investigation. Elle nous semble trop lourde à mettre en œuvre pour des analyses de routine (le délai pour obtenir un résultat peut être estimé à deux jours). Il est clair que, sur base des résultats obtenus par AFLP, la mise au point et la validation sur un nombre étendu d'individus d'un test rapide utilisant la PCR (résultat obtenu dans la journée) est une suite logique de ce travail. Un test de ce type pourrait être utilisé en routine par un laboratoire de contrôle. D'autre part, l'AFLP permet des combinaisons (couple d'enzymes de restriction, nucléotides sélectifs) pratiquement infinies. La technique AFLP, bien maîtrisée par notre laboratoire, peut encore être utilisée pour la recherche de nouvelles bandes discriminantes entre souches de poulets à croissance rapide et souches à croissance lente. La caractérisation des souches à croissance lente les plus largement utilisées commercialement pourrait également être envisagée dans ce cadre. Une valorisation commerciale des résultats de ces recherches (brevet, kits d'analyses) n'est pas utopique.

Contrôle de l'absence d'antibiotique dans les aliments

L'usage des antibiotiques dans les élevages ne semble pas diminuer actuellement. Afin de prévenir une nouvelle crise agricole, il est impératif de maîtriser les intrants (notamment les additifs alimentaires) utilisés en alimentation : les moyens de contrôle doivent être affinés et inclus dans un schéma de détection intégrée. Pour parvenir à une intensification des contrôles, il est impératif de développer des tests

microbiologiques facilement interprétables (avec une réduction maximale des résultats erronés) et des tests analytiques qui permettront de confirmer les résultats obtenus lors de la sélection microbiologique.

Il est nécessaire de réduire le nombre de méthodes d'analyse, souvent dédiées à la recherche d'un seul produit connu, en cherchant à déterminer un maximum de résidus en un minimum de protocoles. Le développement de méthodes alternatives permettant de réduire les confirmations peut constituer une voie de recherche intéressante.

Détection de farine de viande par microscopie-NIR

Les bibliothèques de spectres de particules sont continuellement étendues à de nouveaux échantillons. Le temps d'analyse est actuellement une limitation de la microscopie NIR, le recours à des techniques d'imagerie spectrale, plus rapide pour l'acquisition des spectres, a été envisagé et fait l'objet d'un nouveau projet subsidié par la recherche contractuelle du Ministère des Classes Moyennes et de l'Agriculture. Si au niveau législatif le besoin s'en faisait sentir le développement de modèles permettant une analyse qui ne soit plus uniquement qualitative mais également quantitative pourrait être envisagé.

Références bibliographiques

- Behrens, M., Unthan, M., Brinkmann, Y., Buchholz, R. et Latus, N. (1999). *Fleischwirtschaft* **79**, 97-100
- Cozzolino, D., Murray, I. et Paterson, R. (1996). *Journal of Near Infrared Spectroscopy* **4** : 213-223
- Culioli, J., Touraille, C., Bordes, P. et Girard, J.P. (1990). *Archiv für Geflügelkunde* **53**(6) : 237-245
- Cutting, J.H., Hurlbut, J.A. et Sofos, J.N. (1997). *Journal of AOAC International*. **80**(5) :951-955
- Fumière, O., Sinnaeve, G. et Dardenne, P. (2000). *Journal of Near Infrared Spectroscopy* **8** : 27-34
- Girard, J.P., Culioli, J., Denoyer, C., Berdagué, J.L. et Touraille, C. (1993). *Archiv für Geflügelkunde* **57**(1) : 9-15
- Knorr, C., Cheng, H.H. et Dodgson, J.B. (1999). *Animal Genetics* **30**, 28-35
- Lewis, P.D., Perry, G.C., Farmer, L.J. et Patterson, R.L.S. (1997). *Meat Science* **45**(4) : 501-516
- Meyer, R., Höfelein, C., Lüthy, J. et Candrian, U. (1995). *Journal of AOAC International* **78** : 1542-1551
- Rabot, C., Rousseau, F., Dumont, J.P., Rémygnon, H. et Gandemer, G. (1996). *Viandes et Produits Carnés* **17**(1) : 17-22
- Rabot, C., Gandemer, G., Meynier, A., Lessire, M. et Juin, H. (1999a). *Viandes et Produits Carnés* **20**(3) : 93-97
- Rabot, C., Gandemer, G., Juin, H., Meynier, A. et Lessire, M. (1999b). *Viandes et Produits Carnés* **20**(3) : 97-100
- Sauveur, B. (1997). *INRA Productions Animales* **10**(3) : 219-226
- Touraille, C., Ricard, F.H., Kopp, J., Valin, C. et Leclercq, B. (1981). *Archiv für Geflügelkunde* **45** : 97-104
- Touraille, C., Lassaut, B. et Sauvageot, L. (1985). *Viandes et Produits Carnés* **6**(2) : 67-72
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. et Zabeau, M. (1995). *Nucleic Acids Research* **23**(21) : 4407-4414
- Zimmermann, S., Zehner, R. et Mebs, D. (1998). *Fleischwirtschaft* **78**(5) : 530-533