



# Labinfo

**Publication destinée aux laboratoires de sécurité alimentaire agréés**

- 4 Le typage bactérien : une étape incontournable dans le suivi épidémiologique des maladies infectieuses d'origine alimentaire
- 7 La drosophile du cerisier *Drosophila suzukii* : après l'introduction, l'implantation et les premiers symptômes de dégât, voici maintenant l'analyse des possibilités de maîtrise
- 12 MALDI-TOF MS comme outil d'identification de pathogènes alimentaires
- 15 Manger des insectes
- 18 Next Generation Sequencing pour identifier les OGMs dans les produits alimentaires humains et animaux
- 21 Chromatographie en phase gazeuse à pression atmosphérique couplée à la spectrométrie de masse en tandem (APGC-MS/MS) pour l'analyse des dioxines et des PCB dans les denrées alimentaires et les aliments pour animaux
- 24 Evolution des méthodes de screening pour la recherche des résidus
- 28 Workshops & Symposia



### LabInfo

Publication destinée aux laboratoires de sécurité alimentaire agréés

### Equipe de rédaction

Dirk Courtheyn, Marnix De Gruyter, Conny De Schepper, Alain Dubois, Marc Evrard, Geert Janssens, Alain Laure, Kathleen Martens, Eva Wevers et Marie-Christine Wilem

### Ont participé à ce numéro :

Bert Matthijs, Pierre Wattiau, Hein Imberechts, Hans Casteels, Johan Witters, Nick Berkvens, Marie Polet, Nadine Botteldoorn, Katelijne Dierick, Marnix De Gruyter, Sander Willems, Marie-Alice Fraiture, Sigrid De Keersmaecker, Nancy Roosens, Gauthier Eppe, Georges Scholl, Jean-François Focant, Edwin De Pauw et Philippe Delahaut

### Traduction

Service de traduction de l'Agence  
Equipe de rédaction

### Photos et illustrations

Fournies par les laboratoires

### Mise en page

Gert Van Kerckhove

### Secrétariat de rédaction

LabInfo  
p.a. D. Courtheyn  
AFSCA  
CA-Botanique – Food Safety Center  
4ème étage, bureau K04/120218  
Boulevard du Jardin botanique 55  
1000 Bruxelles  
Tel 02.211.87.33  
dirk.courtheyn@favv.be

Cher lecteur,

Depuis la dernière édition de Labinfo, il s'est passé pas mal de choses. Geert De Poorter, après une belle carrière à l'AFSCA, nous a quittés pour relever de nouveaux défis au SPF Économie.

Moi-même, j'ai accepté, à la demande de notre administrateur délégué Herman Diricks, d'assumer la fonction de Directeur général des Laboratoires ad interim, en attendant la désignation définitive du remplaçant de Geert. Et à peine avais-je eu le temps de me mettre au courant qu'est arrivé le nouveau gouvernement, avec un accord de gouvernement et les économies qui en découlaient. Depuis lors, nous avons travaillé très dur à une stratégie d'économies devant permettre à l'Administration des Laboratoires de disposer aussi à l'avenir des moyens nécessaires pour pouvoir accomplir notre mission et nos tâches principales d'une manière professionnelle en maintenant une excellente qualité.

Il en résulte que nous devons non seulement fournir de sérieux efforts en interne, mais que nous demandons aussi ces efforts à nos principaux partenaires : les laboratoires nationaux de référence (LNR) et les associations de lutte contre les maladies des animaux (DGZ et ARSIA). Les discussions menées dans ce contexte avec ces partenaires ne sont certes pas faciles, mais se déroulent dans un climat serein, ouvert et constructif. Je souhaite les en remercier par le biais de cet éditorial, et j'espère qu'ensemble nous parviendrons à transformer cet exercice d'économies en une opportunité d'améliorer notre fonctionnement à tous. Afin de préserver l'avenir, nous devons sans nul doute être inventifs et encore mieux collaborer, tant avec les LNR qu'avec les laboratoires agréés.

Dans les articles de ce numéro de Labinfo, vous pourrez constater qu'il y a aussi de nouvelles évolutions dans les techniques analytiques et dans les paramètres à déterminer sur le plan de la sécurité alimentaire.

Je vous souhaite beaucoup de plaisir à la lecture de cette treizième édition de Labinfo.

Bert Matthijs  
Directeur général des Laboratoires a.i.

# Le typage bactérien : une étape incontournable dans le suivi épidémiologique des maladies infectieuses d'origine alimentaire

*Pierre Wattiau et Hein Imberechts*

*Unit "Foodborne and Highly Pathogenic Zoonoses", Operational Direction Bacterial Diseases, CODA-CERVA, Groeselenberg 99, 1180 Brussels*

La détection de bactéries pathogènes à tous les niveaux de la chaîne alimentaire implique la mise en œuvre de nombreuses méthodologies différentes au laboratoire. A chaque bactérie sont associées des procédures qui diffèrent selon les caractéristiques de la bactérie, la matrice à analyser, la sensibilité de la détection à atteindre et le niveau de caractérisation du microorganisme souhaité. L'enrichissement, la culture et l'identification constituent les premières étapes d'une analyse bactériologique et délivrent des résultats critiques sur la qualité microbiologique des matrices analysées. Cependant, à eux seuls, ces résultats n'ont que très peu d'utilité lorsqu'il s'agit de retracer l'origine d'une contamination, de comparer des cas cliniques ou de déterminer une source commune d'infection. Pour ce faire, des techniques plus pointues visant à établir l'équivalent d'une empreinte digitale des bactéries sont nécessaires. Le présent article donne un bref aperçu des techniques les plus populaires utilisées dans ce but et leur applicabilité aux différents contextes.

L'identification traditionnelle des bactéries isolées en routine s'arrête en général au niveau de l'espèce ou de la sous-espèce. Dans certains cas, l'identification de sous-types bactériens peut passer par la recherche de caractères biochimiques particuliers (biotypes). Dans d'autres, on recherchera la présence de facteurs de virulence ou de colonisation (pathotypes), on identifiera les antigènes présents à la surface des bactéries (serotypes), on mettra en évidence des caractères génétiques particuliers (genotypes), on caractérisera les toxines produites (toxintypes), on établira le profil de résistance à des virus bactériens de référence (phage types) ou le profil électrophorétique de l'ARN ribosomal fragmenté par des enzymes de restriction (ribotypes) etc. Aucune de ces méthodes « de première ligne » n'est cependant suffisamment sensible que pour établir de façon satisfaisante l'identité ou l'étroite parenté entre plusieurs isolats. Pour ce faire, il faut descendre au niveau de la composition fine des bactéries au moyen de techniques capables de repérer d'infimes différences dans les macromolécules qui les constituent. Les paragraphes qui suivent décrivent brièvement les méthodes de sous-typage basées sur l'ADN parmi les plus populaires avec leurs avantages et leurs inconvénients.

## PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis)

L'électrophorèse en champ pulsé permet d'établir une empreinte fine du génome bactérien en séparant des fragments d'ADN de très grande taille. Cette technique permet de visualiser les différences génomiques consécutives à des délétions, insertions ou réarrangements qui distinguent les bactéries d'une même sous-espèce. Elle est sensible et universelle mais nécessite une main d'œuvre coûteuse et bien entraînée.

## MLVA (Multiple Loci Variable Number of Tandem Repeats Analysis)

Cette technique vise à déterminer la longueur de courtes séquences répétées réparties dans le génome de la plupart des bactéries: le nombre de répétitions étant extrêmement variable d'une souche à l'autre, l'identité ou la proximité de 2 souches peut ainsi être établie de manière très fiable. Quoique relativement simple à mettre en œuvre, la MLVA n'est pas universelle et un schéma de typage propre à chaque sous-espèce doit être préalablement établi et validé. L'hypersensibilité de certains marqueurs, pouvant erronément conclure à des différences entre bactéries identiques, a également été rapportée.

## CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)

Les motifs CRISPR, présents environ chez la moitié des bactéries, sont constitués de groupes de séquences répétées séparés par des séquences uniques dont l'organisation et la composition varient d'une bactérie à l'autre au sein d'une même espèce. Ces séquences peuvent servir à la fois à l'identification de la sous-espèce et à l'identification de groupes d'individus au sein de cette sous-espèce. Facile à mettre en œuvre, cette technique est d'usage limité puisqu'elle ne s'applique qu'aux bactéries qui hébergent des motifs CRISPR dans leur génome.

## MLST (Multiple Loci Sequence Typing)

Cette méthode consiste à déterminer la séquence nucléotidique de quelques gènes (5 à 10) éparpillés dans le génome et qui codent des protéines ancillaires. Son degré de sensibilité varie fortement en fonction des espèces bactériennes considérées et sa mise en œuvre est relativement longue et coûteuse. Elle est d'une grande utilité pour les études taxonomiques et phylogénétiques mais ne présente que peu d'intérêt pour le traçage des épidémies.

## WGS (Whole Genome Sequencing)

Il s'agit ici de déterminer la séquence complète du génome d'une bactérie. Le plus souvent, cette séquence est d'abord constituée d'une multitude de fragments de longueur variant entre 100 et 250 nucléotides selon les techniques et qui sont déterminés un grand nombre de fois pour un même génome. Les chevauchements entre fragments et/ou leurs positions relatives par rapport à une séquence de référence peuvent servir à assembler tout ou partie du génome séquencé. Les techniques de WGS, dont la popularité ne cesse de monter et le coût de diminuer, sont les plus sensibles. Moyennant un traitement informatique approprié, elles permettent d'établir avec la plus grande fiabilité le degré de parenté entre différentes bactéries. Leur utilisation en routine n'est cependant pas encore à l'ordre du jour, même s'il fait peu de doute qu'elles supplanteront tôt ou tard toutes les autres.



## SNP typing (Single Nucleotide Polymorphism typing)

Les données de séquençage peuvent être mises à profit pour identifier des nucléotides dont l'identité varie d'une bactérie à l'autre au sein d'une même sous-espèce. Lorsqu'ils sont interrogés en de nombreux endroits au sein d'un même génome bactérien, ces nucléotides polymorphiques peuvent livrer une signature génétique suffisamment complexe et unique que pour la différencier de n'importe quelle autre. Cette méthode a l'avantage d'être moins coûteuse tout en ne nécessitant pas une instrumentation aussi sophistiquée que pour le WGS. Les plateformes de type micro-arrays sont les instruments de prédilection pour interroger simultanément de nombreux nucléotides polymorphiques différents ou des caractères génétiques remarquables. Plusieurs formats de micro-arrays existent selon qu'ils sont constitués de minuscules « spots » d'ADN imprimés sur des surfaces de verre microscopiques ou de micro-billes recouvertes d'ADN en suspension dans un liquide.

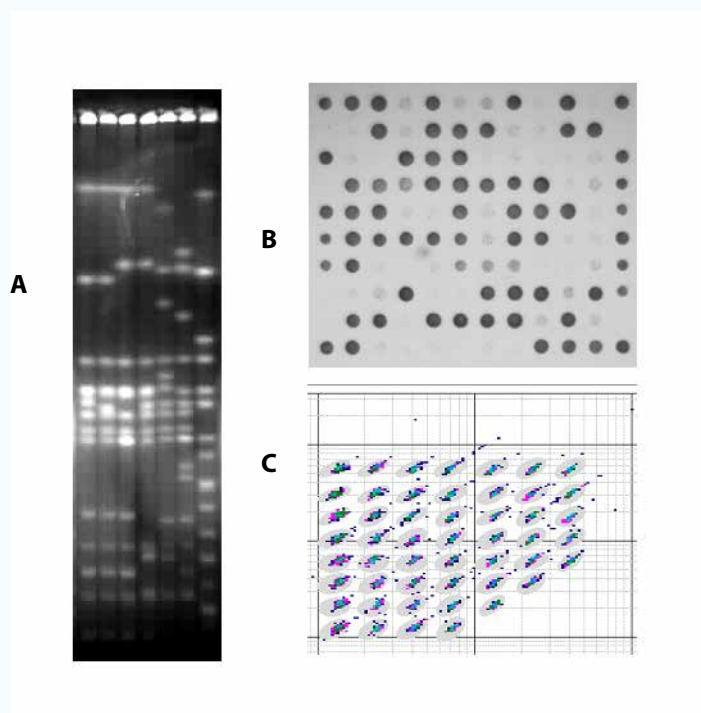


Figure 1. Profil typique d'un résultat de typage bactérien par PFGE (A), par interrogation de SNPs au moyen d'un micro-array d'ADN imprimé sur une micro-plaque de verre (B) ou par interrogations de SNPs au moyen de micro-billes de polystyrène triées par un cytomètre de flux (C).

Pierre.Wattiau@coda-cerva.be

# La drosophile du cerisier *Drosophila suzukii* : après l'introduction, l'implantation et les premiers symptômes de dégât, voici maintenant l'analyse des possibilités de maîtrise

Hans Casteels, Johan Witters et Nick Berkvens

Instituut voor Landbouw- en Visserijonderzoek, Eenheid Plant – Gewasbescherming

Burg. Van Gansberghelaan 96 bus 2, 9820 Merelbeke

## Introduction

L'une des drosophiles les plus connues dans nos contrées est *Drosophila melanogaster* (famille des *Drosophilidae*). Cette drosophile "classique" se rencontre fréquemment au cours des mois d'été sur les fruits mûrs/blets et sur les restes de fruits et légumes dans nos conteneurs pour déchets biodégradables. Malgré le fait que la présence de cette mouche est souvent gênante pour l'homme, elle n'est pas nuisible. De plus, les larves de cette espèce sont utiles et, avec les larves de nombreuses autres *Drosophilidae*, elles jouent un rôle important dans notre écosystème en contribuant à la décomposition de toutes sortes de matières organiques. Plus de 3800 espèces de drosophiles sont répertoriées de par le monde; une mouche de plus ou de moins, ce n'est tout de même pas si grave ?

Eh bien si, dans le cas de la drosophile du cerisier *Drosophila suzukii*, également appelée mouche suzukii, cela peut à terme entraîner de graves conséquences économiques pour le secteur de la culture des fruits. Cette drosophile est l'un des fléaux les plus craints dans la culture des petits fruits et des fruits à noyau en Europe; aux États-Unis et en Europe méridionale. Le manque à gagner peut aller jusqu'à plus de 50%. Contrairement à notre drosophile indigène qui attaque les fruits blets ou endommagés, celle-ci s'attaque également aux fruits verts. Étant donné qu'une attaque au cours des premiers jours suivant la ponte passe inaperçue (les larves se nourrissent en effet de la chair à l'intérieur des fruits), le danger que des fruits infectés se retrouvent sur le marché est grand, avec toutes les conséquences que cela implique pour nos cultivateurs de fruits, nos organisations de criée et nos supermarchés.

Dans l'ordre chronologique, la problématique autour de la drosophile du cerisier est dépeinte depuis la première découverte dans un jardin de particuliers à Ostende (2011) jusqu'aux observations au cours de la période 2012-2014 dans des cultures fruitières, avec ou sans dommages économiques et la proposition de solutions aux professionnels via l'introduction d'une demande de projet LA IWT.



## Origine et introduction

*D. suzukii* est d'origine asiatique. La mouche a été découverte pour la première fois au Japon en 1916. Aux environs de 1930, ce fut au tour de pays comme la Chine et la Corée. Plus tard, la mouche a encore été observée au Myanmar, au Pakistan, à Taïwan et en Thaïlande. Cette drosophile a entamé en 2008 une progression vers l'Amérique du Nord après son introduction en Californie. Entre-temps, cette espèce exotique a déjà été signalée dans de grandes parties des États-Unis ainsi qu'au Canada. Environ au même moment, la mouche a également été introduite en Europe. Pour comble d'infortune, la mouche dispose également d'une bonne capacité d'adaptation aux types de climats européens entraînant une rapide diffusion géographique. La mouche a successivement été observée en Italie (2009), France, Slovénie et Espagne (2010), en Suisse, Allemagne et Belgique (2011) ainsi qu'au Portugal, au Royaume-Uni et aux Pays-Bas (2012). L'augmentation du commerce international en fruits (infectés) est responsable de la diffusion sur de grandes distances et est vraisemblablement à la base de l'introduction en Belgique et dans d'autres pays européens. La diffusion ultérieure en Belgique est la conséquence du commerce intérieur d'une part et de la migration des mouches adultes d'autre part. Cette drosophile nuisible étant déjà largement répandue en Europe, des mesures de quarantaine ne sont plus possibles.

## Cycle de vie

La reproduction de cette espèce de drosophile se déroule très rapidement. Comme pour la plupart des insectes, le développement dépend de la température. En cas de conditions climatiques favorables, le cycle de vie complet ne dure qu'1 à 2 semaines (25-30 °C). Ce cycle de vie court permet à l'espèce d'avoir plusieurs générations par an (au Japon, on en a déjà enregistré jusqu'à 13 par an). Les mâles sont caractérisés par une tache noire bien visible sur chaque aile (photo 1).



Photo 1: mâle *D. suzukii* (photo ILVO)

Après l'accouplement, les femelles pondent en moyenne 350 petits œufs au moyen d'un ovipositeur typique fortement chitinisé et crénelé (photo 2) leur permettant de percer la pelure dure de fruits verts.





Photo 2: ovipositeur femelle (photo ILVO)

Les œufs déposés sont dans la plupart des cas difficiles à détecter sur le fruit récolté de sorte qu'il n'est pratiquement pas possible pour le cultivateur, la criée ou le supermarché de contrôler le fruit apparemment intact. Après 12 à 72 heures, les œufs éclosent pour former des larves se nourrissant du fruit. Il y a trois stades larvaires suivis par un stade pupal qui se déroule dans le fruit ou à sa surface. Après la mue imaginale, les mouches adultes quittent les fruits dans lesquels elles ont grandi. En raison de sa grande fertilité et de sa durée générationnelle courte, cette mouche est en mesure de se reproduire de manière explosive en un temps record. Les conditions d'hivernage sous nos latitudes ne sont pas encore entièrement connues. Il est toutefois bien connu que ces mouches sont encore actives à des températures plus basses en comparaison avec leurs congénères européennes de sorte qu'on peut les observer jusque tard en automne.

## Plantes hôtes et dommages

Pratiquement chaque fruit avec une pelure fine, aussi bien cultivé que sauvage, entre en ligne de compte comme plante hôte mais ces mouches des fruits apprécient tout particulièrement les mûres, les framboises, les fraises, les myrtilles et les cerises. Outre ces fruits, les larves peuvent également se développer dans diverses autres variétés de fruits. Dans le pays d'origine, les dommages sont limités en raison de la présence d'ennemis naturels, mais l'implantation de cette mouche en Belgique pourrait à court terme engendrer d'importantes pertes de récolte. C'est également le cas dans des régions avec un climat tempéré comparable où des dégâts considérables sont possibles en présence d'un petit nombre de générations. La vaste gamme de plantes hôtes, dont font également partie de nombreuses espèces sauvages comme l'aubépine, le sureau, l'églantier et les mûres sauvages complexifie la maîtrise de cette mouche. Tout comme d'autres espèces de drosophiles, la mouche *suzukii* est également en mesure de se développer sur des fruits blets ou en décomposition, même dans nos conteneurs pour déchets biodégradables.

## La première étape vers la construction du savoir: le monitoring

Suite à la première observation dans un jardin de particuliers à Ostende (septembre 2011), l'AFSCA a mis sur pied, en 2012, un réseau de monitoring à l'aide de pièges à appâts (pièges Droso-trap, Biobest) en divers endroits afin de confirmer la présence de *D. suzukii* dans notre pays (photos 3 & 4). Outre les parcelles de fruits, un certain nombre de criées de fruits et de locaux d'entreposage/d'emballage ont également été suivis. Dans ces derniers endroits, aucune mouche *suzukii* n'a été observée que ce soit en 2012 ou en 2013. Pcfruit, CRA-W et GFW (Groupe des Fraisieristes Wallons) ont également suivi la présence éventuelle de cette mouche sur quelques parcelles de fruits.





Photo 3: monitoring dans les mûres, culture abritée (photo AFSCA)



Photo 4: monitoring dans les vergers de cerisiers (photo AFSCA)

Le laboratoire d'entomologie du Centre de diagnostic pour végétaux (ILVO) est responsable de la détection et de l'identification des insectes nuisibles et des acariens dans tous les échantillons prélevés par l'AFSCA dans le cadre de la protection des végétaux. Lors de la campagne de monitoring, tous les insectes capturés ont été soumis à une analyse stéréomicroscopique quant à la présence de mouches *suzukii*; la confirmation s'est également faite au laboratoire d'entomologie qui est en outre agréé en tant que Laboratoire national de référence pour les maladies végétales dues aux insectes.

Au total, 52 sites ont été échantillonnés en 2012 (cerises, fraises, framboises, myrtilles et prunes); *D. suzukii* a été observée pour 14 d'entre eux (26%). Les nombres les plus élevés en Flandre ont été observés dans des cerisiers, mais des *D. suzukii* adultes ont également été découvertes dans des prunes, des fraises, des framboises et des myrtilles. En Wallonie, la plupart des mouches ont été capturées dans des cultures de framboises sous abris. L'observation des mouches *suzukii* tard dans la saison était assez étonnante : les premières mouches, à une exception près (janvier, Gembloux) n'ont été observées qu'à partir de mi-juillet et ce jusque fin décembre. En 2013, le réseau de monitoring a été étendu à 108 sites (reprenant actuellement aussi les mûres, les raisins, les cerises sauvages et les poires). La mouche a été observée sur 76 sites (70%) et de nouveau assez tard dans la période végétative (début août). En certains endroits, des dégâts minimes négligeables ont également été notés. Les observations de 2013 ont démontré que la diffusion de cette drosophile a pris de l'ampleur tant en Flandre qu'en Wallonie. Dans la plupart des cas, de faibles nombres de mouches ont été observés mais dans un verger de cerisiers (insignifiant) quelques centaines d'exemplaires ont été capturés au cours de la période végétative. Le spectre des plantes hôtes dans lesquelles la mouche a été découverte s'est encore étendu. La majeure partie des mouches a été découverte dans des plantations de cerises mais la mouche a également été observée dans des fraises, des framboises, des mûres, des raisins et dans diverses autres baies de même que dans des cerises sauvages. A la fin de l'automne 2013, des larves de *D. suzukii* ont également été découvertes dans des poires non pelées. Tant en 2012 qu'en

2013, les premières mouches adultes n'ont été capturées qu'au deuxième semestre en juillet-août ; la majorité des captures n'a été réalisée que tard en automne (octobre-novembre). Même à de faibles températures, des mouches ont encore été capturées. On peut se demander dans quelle mesure les conditions hivernales rigoureuses en février 2012/mars 2013 ont été néfastes à un développement (plus) rapide de la population. L'hivernage en tant qu'adulte se fait en diapause dans des abris couverts (serres, compost, hangars, végétation avoisinante) et après l'hiver, une reconstruction de la population est à nouveau nécessaire. La durée de vie des mouches est relativement longue (90 à 160 jours) et elles sont déjà actives à une température supérieure à 8°C. *Drosophila suzukii* a donc une longue saison de reproduction ce qui est évidemment favorable pour une extension rapide de la population. Les observations ont été poursuivies en 2014 par Pcfuit et CRA-W sur plus de 90 sites. Il est à noter qu'en 2014, on a pu observer des mouches durant l'hiver et tôt au printemps. L'hiver très doux de 2013-2014 semble avoir eu ici un rôle à jouer. Il n'y a eu que trois jours de gelée; la température moyenne était de 6,3°C alors qu'elle est normalement de 3,6°C. C'est probablement pour cette raison que des mouches *suzukii* ont également été détectées dans les pièges de monitoring en hiver et au printemps 2014. En juin 2014, des dommages ont été constatés sur les cerises. Dans le courant de juillet, les dégâts dans les baies, mûres, fraises et framboises étaient en augmentation. La pression du fléau dans les autres pays européens est également plus importante que les années précédentes.

## Analyse complémentaire

Ce que représentent, dans un proche avenir, les captures pour toutes les cultures de petits fruits/fruits sucrés (fraises, baies, framboises, raisins, etc) ainsi que les fruit à noyau (cerises) est en ce moment difficile à estimer. Les dommages aux fruits restent jusqu'à présent limités mais prennent de l'ampleur. Naturellement, l'ILVO, Protection des végétaux continue à suivre la progression des "vols". Dans le cadre de la problématique dépeinte ci-dessus, une demande de projet IWT a été introduite avec le Proefcentrum Fruitteelt. Celle-ci a également été approuvée. Ce projet, dans un premier temps, étudiera en détails les caractéristiques clés de cette mouche comme la phénologie, la dynamique de population, la capacité/les stratégies d'hivernage, la préférence pour certains types de fruits,...). L'attention nécessaire sera également accordée aux possibilités de survie dans des conditions extrêmes (tolérance au chaud/froid). Pour la maîtrise effective des mouches *suzukii* déjà présentes dans les exploitations de fruits, on se focalisera sur le développement optimal de techniques de "mass-trapping" et "attract and kill". Étant donné que l'hygiène de culture est également une donnée cruciale dans la maîtrise de cette drosophile nuisible du cerisier, une solution innovante sera élaborée pour l'évacuation pratique des déchets de fruits et l'élimination à différents stades de développement de cette mouche potentiellement présente. On pense ici au développement d'un conteneur de compost permettant l'élimination efficace des différents stades de la mouche d'une part lors des premières phases de compostage et d'autre part que les fruits infectés, après un bref séjour dans le conteneur, puissent poursuivre le processus de compostage sans aucun risque.

## Conclusion

Les résultats du monitoring démontrent que la mouche *suzukii* peut survivre dans des végétaux cultivés ou sauvages et semble bien résister aux basses températures. Malgré le fait qu'un certain nombre de produits disposent d'un agrément pour l'utilisation contre cette drosophile (spinosad, diméthoate et lambda-cyhalothrine), un traitement chimique n'est pas simple en raison des résidus possibles lors de la récolte et la présence de l'insecte sur les espèces sauvages. Nous pouvons donc faire une croix sur une éradication rapide. Cette espèce exotique restera ici et continuera probablement à étendre son territoire. Des recherches plus approfondies sont donc nécessaires afin de développer des stratégies de maîtrise pratiques et utilisables pour éviter une propagation encore plus importante et des dommages économiques dans le secteur de la culture des fruits.

[hans.casteels@ilvo.vlaanderen.be](mailto:hans.casteels@ilvo.vlaanderen.be)



# MALDI-TOF MS comme outil d'identification de pathogènes alimentaires

Marie Polet, Nadine Botteldoorn et Katelijne Dierick

LNR Microbiologie alimentaire / NRL Levensmiddelen microbiologie, Rue Juliette Wytsmanstraat 14, 1050 Bruxelles

En microbiologie, la confirmation et l'identification des bactéries se basaient au début principalement sur la morphologie. Puis sont apparus les tests biochimiques en tubes à essai qui ont été par après miniaturisés. Ensuite ont été développés la PCR suivie par le MALDI-TOF MS (ou matrix-assisted laser desorption-ionization – time of flight mass spectrometry). Le MALDI-TOF MS est déjà utilisé depuis une vingtaine d'années dans différents domaines d'application et en particulier dans les laboratoires de chimie pour la détection de molécules diverses comme les sucres, les acides nucléiques et les protéines. Plus récemment, la technique s'est élargie au diagnostic vétérinaire et au niveau environnemental. Elle est maintenant en plein essor dans les laboratoires d'analyse de microbiologie comme système d'identification. Actuellement, au niveau mondial, environ 1000 installations existent dans le secteur clinique et pharmaceutique et une centaine dans le secteur alimentaire.

Sur le plan de la sécurité alimentaire, cette technique remplit les exigences nécessaires à la confirmation et à l'identification des pathogènes alimentaires. Plus rapide que les méthodes de microbiologie traditionnelles et ayant le même niveau de discrimination que celles-ci, moins chère et nécessitant moins d'expertise technique que les méthodes génotypiques, le MALDI-TOF MS peut en outre être utilisé dans les laboratoires d'analyses de microbiologie alimentaire de routine où le facteur temps joue un rôle clé étant donné que ces laboratoires travaillent principalement avec les industries alimentaires. Cette technique trouve aussi sa place dans le cas des toxi-infections alimentaires.

La technologie MALDI-TOF MS en microbiologie peut identifier les microorganismes jusqu'au niveau de l'espèce. Le principe se base sur l'ionisation des protéines bactériennes par un rayon laser et la création de pics caractéristiques (spectre). À partir d'une base de données de spectres, le logiciel associé recherche la correspondance à l'espèce de la bactérie selon un indice de fiabilité entre les deux spectres. Le MALDI-TOF MS ne donne toutefois pas d'information sur le sérotype ni sur la pathogénicité de l'espèce (ex : *Vibrio parahaemolyticus*).

Typiquement, un spectromètre de masse est composé de 3 éléments : une source d'ions (MALDI), une séparation des molécules (TOF) et la détection.

## MALDI-MS :

L'analyte est d'abord co-cristallisé à des petits composés organiques (matrice) pour le protéger d'un contact direct avec le faisceau ionisant et éviter sa dégradation. Ceux-ci vont absorber la radiation du laser UV et transférer l'énergie aux protéines qui s'ionisent positivement. Les ions générés vont se libérer des protéines. Les molécules chargées (+1) sont alors accélérées dans un champ électrique.

## TOF :

Après leur passage dans le champ électrique, les ions entrent dans un tube non soumis à un champ électrique et sont séparés selon leur masse-charge. Les ions prennent des vitesses différentes car les grosses molécules se déplacent plus lentement que les petites. Ensuite, un analyseur de temps de vol va détecter le passage de chaque ion et créer les pics sur le spectre qui par après est comparé à une base de données. Certains composants du spectre sont spécifiques à un genre, d'autres à une espèce voire une sous-espèce. Selon la qualité et la pureté de l'échantillon et le nombre de spectres de référence dans la base de données, l'identification de la bactérie se fait en quelques secondes à quelques minutes.

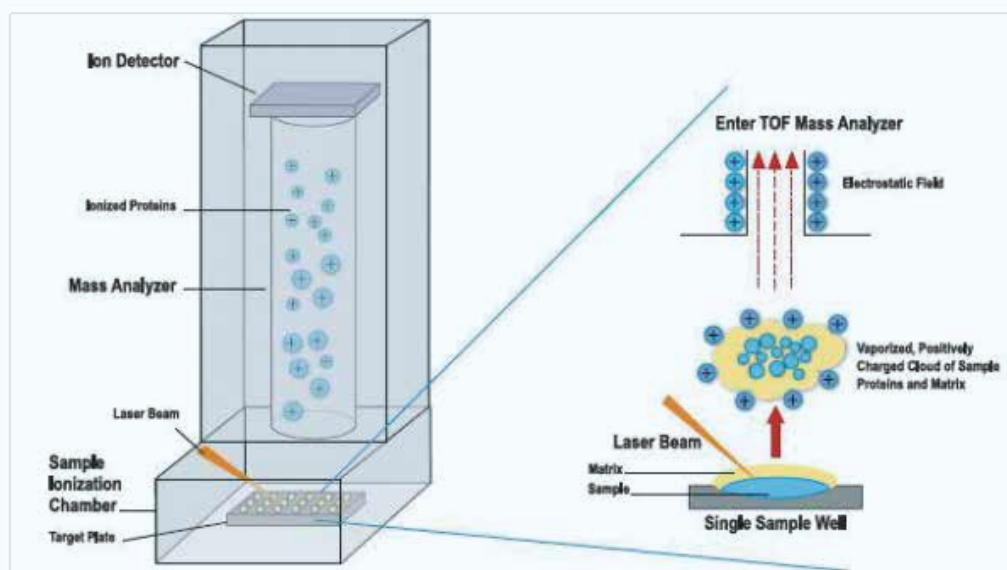


Figure 1 : Principe de fonctionnement d'un spectromètre de masse de type MALDI-TOF

Tous les types de microorganismes alimentaires peuvent être recherchés suivant le même protocole.

La préparation de l'échantillon d'analyse est une étape cruciale dans les analyses MALDI-TOF MS. En effet, pour avoir des résultats d'identification fiables et reproductibles, il est nécessaire d'avoir des conditions de croissance (temps et température d'incubation, milieu de culture) de la bactérie similaires d'un test à l'autre. L'analyse démarre à partir d'une culture pure de bactéries. Celle-ci peut être utilisée telle quelle ou subir un pré-traitement. Les analyses doivent être réalisées avec des cultures de bactéries fraîches car le stress dû au froid ou une déficience en nutriments peut modifier la composition des protéines et donc avoir un impact sur le résultat de l'analyse.

La qualité de la base de données est aussi un point critique dans la précision de l'identification des bactéries. Les nombreuses études sur l'identification des bactéries par le MALDI-TOF MS ont été réalisées sur des échantillons cliniques, et les exigences spécifiques aux laboratoires de microbiologie alimentaire ne sont généralement pas considérées. Seuls quelques rapports étudient l'application du MALDI-TOF MS à la microbiologie alimentaire. Quelques études révèlent que l'obstacle majeur dans l'identification d'isolats alimentaires est lié à la base de données qui doit être actualisée régulièrement avec des spectres de référence venant de souches alimentaires.

Tableau 1 : Avantages et inconvénients de l'application du MALDI-TOF MS à la microbiologie alimentaire

AVANTAGES	INCONVENIENTS
Préparation de l'échantillon universelle pour bactéries, levures et moisissures	Coût élevé de l'achat de l'appareil
Protocole simple	Cultures fraîches pour analyses
Coûts opérationnels bas (consommables, personnel)	Influence du milieu de croissance sur le résultat d'analyse ?
Pas de déchets	La base de données doit être suffisamment grande pour discriminer correctement certaines bactéries très proches, comme <i>E. coli</i> et <i>Shigella</i> spp
Résultat très rapide	Ne donne pas d'indication sur la pathogénicité de l'espèce (ex : <i>Vibrio parahaemolyticus</i> )
La base de données peut-être facilement élargie	Les espèces qui posent problème avec l'identification par 16S donnent parfois les mêmes problèmes avec cette technique

Le MALDI-TOF MS sera intégré au niveau des tests d'identification dans la révision actuelle de l'ISO 7218, à côté des galeries biochimiques, de l'utilisation des sondes nucléiques et des tests d'agglutination.

En conclusion, le MALDI-TOF MS est un outil prometteur dans l'identification des bactéries dans les laboratoires de microbiologie alimentaire de routine. Le protocole simple, la rapidité des résultats et le faible coût des analyses sont les principaux avantages de cette technique qui trouve bien sa place dans la sécurité de la chaîne alimentaire.

## Littérature:

<http://www.biomerieux.com/fr/spectrometrie-de-masse-maldi-tof>

Pavlovic, M., et al. "Application of MALDI-TOF MS for the Identification of Food Borne Bacteria." *Open.Microbiol.J.* 7 (2013): 135-41

Marie.Polet@wiv-isp.be

# Manger des insectes

Marnix De Gruyter

FLVVG, Braemkasteelstraat 59, 9050 Gentbrugge

## Introduction

Manger des insectes: cela peut paraître, pour la plupart d'entre nous, occidentaux, assez étrange voire même répugnant. Nous sommes habitués, depuis des siècles déjà, à nos espèces animales domestiques qui nous fournissent à longueur d'années des viandes et autres produits utiles comme la laine, le cuir et le lait. Cela ne semble pourtant pas si anormal que cela pour une grande partie de la population mondiale. Les insectes font partie du régime alimentaire de près de 2 milliards d'êtres humains et ce principalement dans les régions tropicales. De par le monde, on estime à 1900 le nombre d'espèces différentes d'insectes consommées. Elles appartiennent à une grande diversité de groupes. Près de 31% des insectes consommés appartiennent à l'ordre des *Coleoptera* (coléoptères), 18% sont des chenilles de *Lepidoptera* (papillons) et 14% sont des *Hymenoptera* (hyménoptères comme les abeilles et les guêpes). Mais les sauterelles et les termites sont également souvent au menu.

Pourquoi cela a-t-il perduré sous les tropiques et pourquoi cela ne s'est-il pas étendu au monde occidental? Il y a un certain nombre d'explications à cela. Il y a tout d'abord la prise de distance de l'Occident vis-à-vis de la nature. Les insectes sont davantage considérés comme des nuisibles qui menacent les cultures et transmettent des maladies. Dans les régions tropicales, ils sont toutefois devenus partie intégrante de l'environnement naturel et de la culture (par ex. comme médicament). Dans notre culture, les insectes jouent un rôle accessoire, à l'exception de quelques uns qui nous fournissent des produits utiles comme les vers à soie et les abeilles. De plus, il y a également une aversion pour la consommation d'insectes pour des raisons esthétiques ou parce qu'on l'associe à un comportement primitif. C'est pourquoi l'agriculture n'y a jamais porté d'intérêt.



## Pourquoi les mangerions-nous?

La consommation d'insectes offre pourtant de nombreux avantages par rapport à notre bétail traditionnel. La population mondiale se chiffre en ce moment à 7 milliards d'habitants et dans un proche avenir, elle passera à 9 milliards. Près d'un milliard de ces personnes souffriront de la faim. Cela peut également menacer la stabilité politique de certains pays. La croissance de la population mondiale exercera une forte pression sur l'environnement. L'élevage traditionnel est très polluant. Il est une source importante de gaz à effet de serre puisqu'il en est le second plus gros producteur après la production d'énergie. La consommation d'eau pour l'élevage est considérable. La production d'1 kg de viande nécessite 3682 litres d'eau.



Les choses sont toutes autres pour les insectes. Ils nécessitent beaucoup moins d'espace et d'eau. La conversion en aliments est grande en comparaison avec le bétail : les grillons se contentent de 2 kg d'aliments pour produire 1 kg de poids corporel. La production de gaz à effet de serre est négligeable. L'élevage sur des déchets humains est également possible, ce qui peut contribuer à endiguer la pollution environnementale (bien qu'un inconvénient y soit lié, à savoir l'ingestion de métaux lourds). Les insectes sont faciles à élever et se reproduisent rapidement. Aucune grande installation coûteuse n'est nécessaire. En Thaïlande, on élève des grillons dans de simples bacs métalliques avec une couche de déchets de riz sur le fond. Des bouteilles en plastique apportent l'eau potable. Un filet à fines mailles est étendu au-dessus des bacs pour éviter que les insectes ne s'échappent. Les femelles pondent leurs œufs dans des coupelles remplies de sable et de balle de riz grillée. Les coupelles sont enlevées et placées dans un autre bac métallique. Chaque coupelle est couverte de riz afin de garantir une température d'incubation constante. Il faut toutefois entourer les coupelles d'eau afin d'empêcher les fourmis esclavagistes d'y pénétrer. Cette production à un niveau non industriel peut être suffisante pour nourrir tout un village. Les frais dérisoires d'installation impliquent également que les moins nantis peuvent participer au processus de production.

De plus, les insectes sont très nourrissants. De nombreux insectes contiennent 60% ou plus de protéines qui sont bien digestibles pour l'homme. La teneur en graisse varie fortement, de 7 à 77 g/100 g de poids sec. La teneur en cholestérol est généralement quelque peu inférieure à celle de la viande mais les insectes contiennent plus d'acides gras essentiels (acide linoléique et acide linoléique). La teneur en calories des insectes varie entre 293 et 762 kcal/g de poids sec. De plus, de nombreux insectes semblent être très riches en minéraux essentiels comme le zinc, le cuivre et le fer et en vitamines comme la thiamine et la riboflavine. En terme de valeur nutritionnelle, les insectes peuvent être comparés à d'autres aliments d'origine animale comme la viande, le poisson et les crustacés. Leur teneur en fibres est, de plus, beaucoup plus élevée.

## Dangers potentiels

Malgré tous ces avantages, il y a tout de même un certain nombre de points qui réclament l'attention. Les insectes sont riches en nutriments ce qui fait d'eux un milieu de culture attrayant pour les micro-organismes. Tout comme l'homme, ils ont une flore intestinale. Celle-ci peut contenir divers pathogènes, entre autres *Salmonella* et *Campylobacter*. Il semble que ces bactéries survivent moins de 72 heures et ne représenteraient donc pas un grave danger. Les pathogènes des insectes appartiennent parfois à des groupes taxonomiques différents de ceux de l'homme. Ils ont un cycle de vie entièrement différent de celui des pathogènes humains et ne représentent donc aucun danger.

Le principal danger lié aux micro-organismes n'est donc pas tant la flore intestinale des insectes mais le stockage et la conservation des produits en toute sécurité. Une analyse de vers de farine a indiqué que des *Enterobacteriaceae* et des bactéries sporulantes ont pu être isolées sur les insectes frais. Les premières disparaissent après une cuisson de 5 minutes mais pas les organismes sporulés. Il est indiqué de conserver les insectes au frais à une température de 5 à 7°C. A cette température, on évite tant l'altération des insectes frais que celle des insectes cuits pendant 2 semaines. Toutes les *Enterobacteriaceae* ne semblaient pas mortes après que les insectes aient été rôtis. Les moisissures sont probablement aussi une source de danger. Certaines espèces de moisissures produisent des mycotoxines en grandes quantités. Manger fréquemment des insectes peut donc de cette manière être nuisible. La propagation des moisissures peut être évitée par la conservation au frais ou par un procédé de séchage.



Il est connu que certains insectes peuvent contenir des parasites. Certains parasites utilisent les insectes comme vecteur. Un exemple important est *Trypanosoma*, un parasite occasionnant la maladie de Chagas. Il est ressorti d'une étude que le parasite pouvait également infecter l'homme par voie orale et des liens ont été établis avec la consommation d'insectes crus. Les insectes peuvent également être porteurs d'autres parasites dangereux comme *Entamoeba histolytica* ou *Toxoplasma*. Il n'est donc pas sans danger de consommer des insectes crus.

Un autre danger de la consommation d'insectes sont les pollutions chimiques. Il s'agit tout d'abord des pesticides. Tous constituent un danger potentiel pour l'homme, surtout si les insectes sont recueillis dans la nature plutôt qu'élevés, auquel cas un meilleur contrôle est possible. De manière générale, les pesticides chlorés ne semblent plus être présents en grandes quantités mais les composants organophosphorés peuvent représenter un danger potentiel.

Tout comme pour les champignons, certains insectes peuvent contenir des constituants très toxiques alors que d'autres en sont exempts. Les insectes utilisent ces toxines comme répulsifs. Ils peuvent puiser les substances dans les plantes sur lesquelles ils vivent et ensuite les entreposer dans des organes spéciaux. De tels insectes peuvent générer un danger potentiel. Certaines de ces substances perdent toutefois leur activité lorsqu'on cuit les insectes. Il y a également des insectes qui produisent leurs propres toxines comme les abeilles et les fourmis. De telles substances sont neutralisées dans notre tractus digestif. On est arrivé à la conclusion que les insectes vivant sur des plantes comestibles pour l'homme peuvent généralement être consommés en sécurité mais que les autres peuvent tout de même représenter un danger potentiel. Dans certains cas, il est possible d'ôter les organes contenant les composants toxiques. En Italie occidentale, par exemple, il est de coutume de manger des larves de papillons du genre *Zygaena*. Ces derniers contiennent toutefois des glycosides cyanogènes pouvant libérer de l'acide cyanhydrique. Les consommateurs mangent donc uniquement les appendices sucrés exempts de substances toxiques.

Il est important de savoir que certains insectes peuvent également contenir des substances ayant un impact sur l'absorption de vitamines (ce que l'on appelle les substances antinutritionnelles). Manger des chenilles d'*Anaphe venata* semble entraver l'absorption de thiamine, de sorte qu'après un certain temps, on peut observer une carence. Cela peut poser un problème, surtout dans les régions avec un approvisionnement alimentaire déficient.

Finalement, les insectes peuvent également ingérer des métaux lourds et les emmagasiner. De grandes quantités d'arsenic et de plomb ont été découvertes dans certains insectes. Cela peut être lié à leur mode de vie. Ceux qui vivent de préférence au sol ingèrent probablement aussi plus de métaux toxiques. Dans le cas où les insectes servent de nourriture aux volailles, par exemple, le métal peut de cette manière être introduit dans la chaîne alimentaire.

Ces dangers potentiels doivent être quelque peu nuancés. On peut en éviter beaucoup en traitant les insectes de manière hygiénique comme cela se fait actuellement pour le bétail. Elever les insectes dans des "fermes" permet un meilleur contrôle. Les parasites sont par exemples liés à un environnement naturel pour leur cycle. L'élevage diminue également l'ingestion de métaux. Les insectes peuvent être élevés de manière sélective. On peut ne prendre en compte que les espèces pour lesquelles on est sûr qu'elles ne contiennent pas de substance nuisible. Un certain contrôle sera cependant toujours nécessaire, comme c'est actuellement le cas pour d'autres aliments.

Marnix.DeGruyter@favv.be



# Next Generation Sequencing pour identifier les OGMs dans les produits alimentaires humains et animaux

Sander Willems<sup>1\*</sup>, Marie-Alice Fraiture<sup>1,2\*</sup>, Sigrid C. J. De Keersmaecker<sup>1</sup> and Nancy H Roosens<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Plateforme Biotechnologie et Biologie Moléculaire, Institut Scientifique de santé Publique, rue J. Wytsman 14, 1050 Bruxelles, Belgique

<sup>2</sup> Instituut voor Landbouw- en Visserijonderzoek (ILVO), Eenheid Technologie & Voeding (T&V), Burg. Van Gansberghelaan 115, 9820 Merelbeke, Belgium

\*contribution égale

La croissance du nombre et de la diversité d'OGMs présents sur le marché rend l'usage de la technologie de PCR en temps réel utilisée comme 'golden » standard dans l'analyse OGM de plus en plus complexe et laborieuse afin de détecter un OGM dans des échantillons alimentaires humains et animaux. En effet, un nombre croissant de méthodes de criblages et spécifiques aux événements GM (ciblant, respectivement, le(s) élément(s) GM et la jonction entre la cassette GM et le génome de l'hôte) doit être développé et utilisé par les laboratoires de contrôle afin de couvrir tous les OGMs autorisés dans un pays. De plus, la stratégie de PCR en temps-réel implique la connaissance au préalable de la séquence, au moins partielle, de la cassette GM. Collecter ces séquences pour les OGMs non-autorisés représente un défi et la conception de chaque méthode correspondante est extrêmement longue, voire impossible vu les nombreux éléments GM possiblement présents dans les OGMs non-autorisés. Cela pose un problème majeur car les OGMs restent indétectables si aucune méthode ciblant l'élément GM n'a été utilisée dans l'échantillon testé. Récemment, pour relever le défi de la détection des OGMs dans les matrices alimentaires humaines et animales, le Next Generation Sequencing (NGS), permettant un séquençage massif en parallèle de fragments d'ADN résultant en millions de « reads » a été proposé comme une technologie prometteuse.

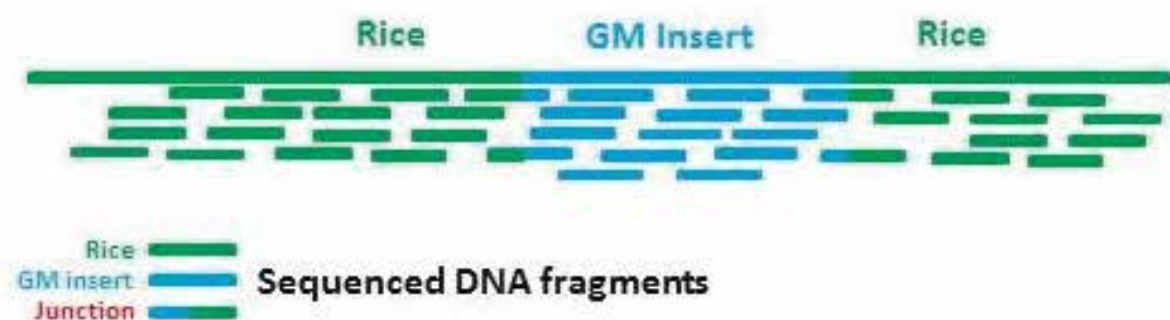


Figure 1: Séquençage massif de fragments d'ADN (reads) d'un OGM, produit par la technologie NGS

Dans ce contexte, l'Institut Scientifique de Santé Publique (WIV-ISP) a démarré une étude pionnière financée par le projet UGMMONITOR (SPF convention RF 11/6242) et EPIGMO (Ylief). Cette étude a premièrement utilisé la technologie NGS pour évaluer son application potentielle pour détecter et identifier un OGM dans différents types de matrices alimentaires (figure 1), tels que des grains de riz 100% GM, des grains de riz 10% GM et des nouilles de riz 100% GM (aliment transformé) (figure 2). Deuxièmement, pour évaluer l'utilisation potentielle du NGS par des scientifiques « non-initiés » en bioinformatique », les données ont été analysées en utilisant deux plateformes différentes : une plateforme commerciale simple d'utilisation (CLC Genomics Workbench), sans nécessité d'une expérience approfondie en bioinformatique, et une plateforme « maison » permettant un meilleur contrôle du workflow et des paramètres et, par conséquent, exigeant un plus haut niveau d'expertise en bioinformatique. Troisièmement, un système statistique conceptuel a été développé et appliqué pour estimer la quantité de « reads » nécessaires pour être capable de détecter et identifier plusieurs OGMs communs mis à des concentrations représentatives de matrices alimentaires humaines et animales « typiques ».

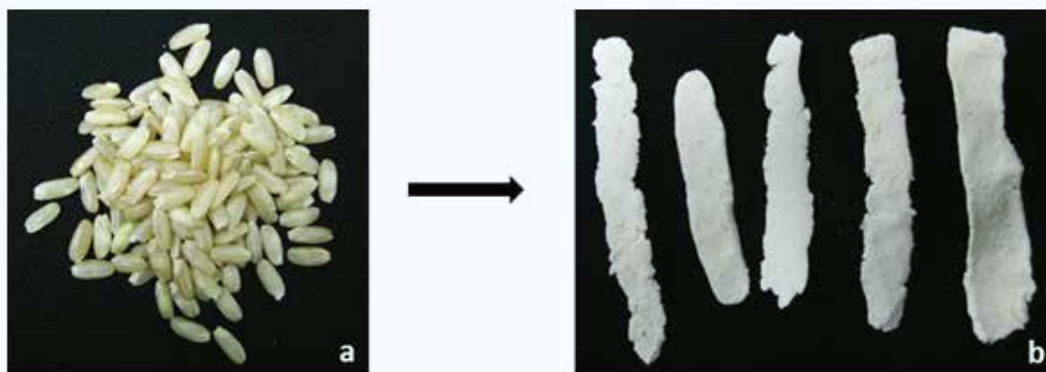


Figure 2: Types de matrices de riz utilisées dans cette étude: grains de riz (a) et nouille de riz "maison" préparées à partir des grains de riz (b).

Nos résultats montrent qu'il est possible d'utiliser le NGS pour identifier et caractériser tous les types d'échantillons envisagés dans cette étude. L'analyse requiert seulement une connaissance au préalable de la séquence, au moins partielle, de la cassette GM et du génome de l'hôte utilisé comme référence durant le mapping/l'alignement des « reads ». C'est pourquoi, la stratégie NGS permet d'utiliser une approche standardisée pour tout type d'OGMs, en contraste avec le développement de méthodes spécifiques et l'utilisation qui doit être conçue individuellement pour chaque OGM lors de l'usage de l'approche de PCR en temps réel. De plus, une matrice transformée telle que les nouilles de riz, donnant de l'ADN dégradé après l'extraction d'ADN de l'échantillon, n'est pas un problème dans l'utilisation de la technologie NGS (Illumina).

L'étude souligne aussi que le développement de nouveaux logiciels de visualisation spécifique facile d'utilisation est nécessaire pour analyser efficacement et fournir les connaissances aux utilisateurs, en particulier dans le contexte actuel du manque d'expertise en bioinformatique dans les laboratoires de contrôles.

Le modèle statistique conceptuel a indiqué qu'un large génome, comme celui du blé, requière un plus grand nombre de « reads » (c'est-à-dire une couverture de séquençage plus élevée ou une profondeur de séquençage plus large), résultant dans des coûts plus élevés par échantillon mais à un prix abordable pour un « laboratoire de contrôle » quand l'OGM est présent à 100%. Cependant, la détection de petites quantités d'ADN GM (1%) dans un mélange d'ADN de plantes est à l'heure actuelle impossible si l'on considère le coût et la complexité de l'analyse.

La présente étude offre des informations préliminaires sur certains atouts et faiblesses majeurs de la technologie NGS qu'il est nécessaire d'adresser avant la considération d'utilisation en routine du NGS dans l'analyse OGM. Pour conclure, le NGS a le potentiel de résoudre les problèmes communs dans la détection d'OGMs. Cependant, avant toute mise en œuvre en routine, des projets de recherches étendus et des lignes directrices pour sa validation sont nécessaires.

Les résultats détaillés de cette recherche ont été soumis pour une publication peer-reviewed.

## Remerciements

Cette recherche est financée par le Service Public Fédéral de la Santé publique, la Sécurité de la Chaîne alimentaire et de l'Environnement (convention RF 11/6242) à travers le projet UGMMONITOR. Les auteurs tiennent également à remercier Emmanuel Guiderdoni (CIRAD, UMR AGAP, Biological Systems department, Montpellier, France) pour sa gentillesse à fournir les grains de riz.

nancy.roosens@wiv-isp.be

# Chromatographie en phase gazeuse à pression atmosphérique couplée à la spectrométrie de masse en tandem (APGC-MS/MS) pour l'analyse des dioxines et des PCB dans les denrées alimentaires et les aliments pour animaux

*Gauthier Eppe\*, Georges Scholl, Jean-François Focant et Edwin De Pauw  
CART University of Liège, Allée de la Chimie 3, B-6c Sart-Tilman, B-4000 Liège, BELGIUM*

## Introduction

Il y a deux ans, nous avons discuté dans ce bulletin de l'utilisation de la GC-MS/MS en tant que nouvelle option pour la confirmation de l'analyse de PCDD/F et de DL-PCB (PCB de type dioxines) dans le cadre de contrôles officiels de denrées alimentaires et d'aliments pour animaux. Plus tard, cette nouvelle approche de confirmation a été étendue à l'autocontrôle des opérateurs professionnels dans le secteur de l'alimentation humaine et animale. Dans le présent bulletin nous faisons l'inventaire des différents outils permettant de réaliser l'analyse de dioxines avec des spectromètres de masse autres que les instruments à secteurs à haute résolution (HRMS), en mettant spécifiquement l'accent sur la chromatographie en phase gazeuse à pression atmosphérique couplée à la spectrométrie de masse en tandem (APGC-MS/MS).

L'analyse des PCDD/F et des PCB par GC-MS/MS n'est pas un concept neuf, les premiers ouvrages scientifiques faisant état du développement de la méthode datent des années nonante, et concernent principalement l'utilisation de spectromètres de masse à piège à ions. La méthode était en mesure de détecter facilement des niveaux de traces de PCDD/F et de PCB dans des échantillons environnementaux. Le manque de sensibilité pour atteindre des niveaux inférieurs à la part par trillion (ppt) dans les denrées alimentaires rendait la technique inadéquate pour des applications à des plans de surveillance. La nouvelle génération de triple quadripôle, récemment lancée sur le marché par plusieurs constructeurs, a véritablement fait un pas en avant en terme de sensibilité de détection. Les premières études de validation effectuées en food and feed ont mis en évidence les potentialités de la technique. Par la suite, ces études ont conduit à la modification de la législation de l'UE en intégrant le système GC-MS/MS comme méthode de confirmation (252/2012/CE) [1]. A ce stade, il est important de souligner que seule la dernière génération de triple quadripôle est à même d'atteindre les critères de performance de la législation de l'UE. Le risque sous-jacent pour les laboratoires ne possédant pas l'expérience requise et n'étant pas équipés de la dernière génération de triple quadripôle, est de se lancer dans ce type d'analyse avec finalement peu de chances de réussite à la clé. En effet, le nouveau Règlement de l'UE modifiant le 252/2012/CE (589/2014/CE) [2] est orienté sur les performances analytiques, indiquant qu'une méthode de confirmation ne peut être utilisée que si la méthode a démontré par une validation complète que tous les critères de qualité et de performance énumérés dans le document susmentionné de l'UE ont été respectés. De nombreuses études analytiques ont été réalisées au cours de ces deux dernières années dans le réseau des laboratoires européens et nationaux de référence (UE-LR/LNR) pour évaluer la méthode GC-MS/MS comme méthode de confirmation. La plupart de ces études ont démontré la possibilité d'atteindre des performances analytiques comparables à la GC-HRMS à des niveaux de concentration pertinents. Ces études ont cependant mis en évidence que le choix du spectromètre de masse reste une question essentielle.



## APGC-MS/MS

Parmi les différentes possibilités d'analyser des niveaux de traces de dioxines et de PCB dans les denrées alimentaires et les aliments pour animaux, l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) est une technique d'ionisation chimique douce qui produit majoritairement des ions moléculaires ou pseudomoléculaires abondants  $[M^+]$  par transfert de charge ou par protonation  $[M+H]^+$  (Figure 1). Bien que les premiers développements de sources APCI aient été utilisés lors du couplage de la MS avec la chromatographie liquide (LC), l'interface d'ionisation peut aussi être connectée à la GC. Ce mode d'ionisation rend la technique appropriée pour générer à la fois des fragments MS/MS sélectifs et intenses pour un suivi en mode Multiple Reaction Monitoring (MRM) et ce, pour de nombreuses applications analytiques de types ciblées. Ce mode d'ionisation diffère de l'ionisation électronique (EI) à haute énergie (70eV), qui souffre généralement d'une fragmentation intensive et où la sélection de l'ion précurseur est toujours un compromis entre la sélectivité et la sensibilité. Dans certains cas, pour des molécules moins stables, cela pourrait compliquer l'application d'une approche MS/MS quantitative en raison du manque d'ions précurseurs spécifiques/abondants. Récemment les développements de la technique APGC-MS/MS ont abouti à des applications analytiques pour les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) [3], les pesticides [4], les éthers diphényliques polybromés (PBDE) [5] ou encore les PCDD/F et PCB [6]. Par exemple, Kotz et al. ont montré que la quantité absolue de 2,3,7,8 TCDD injectée sur colonne et analysée par APGC-MS/MS, en sélectionnant deux ions précurseurs, p.ex. 320 et 322 m/z  $[M^+]$ , donnant les deux ions produits 257 et 259 m/z  $[M-COCl]^+$  (Figure 1) est inférieure à 10 femtogrammes ( $1 \text{ fg} = 10^{-15} \text{ g}$ ), offrant une sensibilité instrumentale comparable à celle obtenue avec des appareils à secteurs (HRMS). Par comparaison avec la méthode GC-EI-MS/MS, Kotz et ses collaborateurs ont également fait état de 50 fg de 2,3,7,8TCDD injectés sur colonne [7]. Dans une autre étude par GC-EI-MS/MS, Fürst et ses collaborateurs ont atteint le même niveau de performances. Le point d'étalonnage le plus bas pour les PCDD/F était de 100 fg injectés sur la colonne avec une excellente linéarité allant de 0.1 à 10 pg injecté sur la colonne [8]. L'Homme et al. ont rapporté une limite instrumentale de quantification (iLOQ) de 0.016 mg/ $\mu\text{L}$  pour le 2,3,7,8-TCDD (80 fg sur colonne de GC), avec également un instrument de type EI-GC-MS/MS [9]. Tous ces travaux ont montré, pour un nombre limité d'échantillons, une sensibilité suffisante pour l'application de la méthode à des plans de surveillance pour des contrôles aux niveaux des teneurs maximales en PCDD/F et PCB dans les denrées alimentaires et les aliments pour animaux.

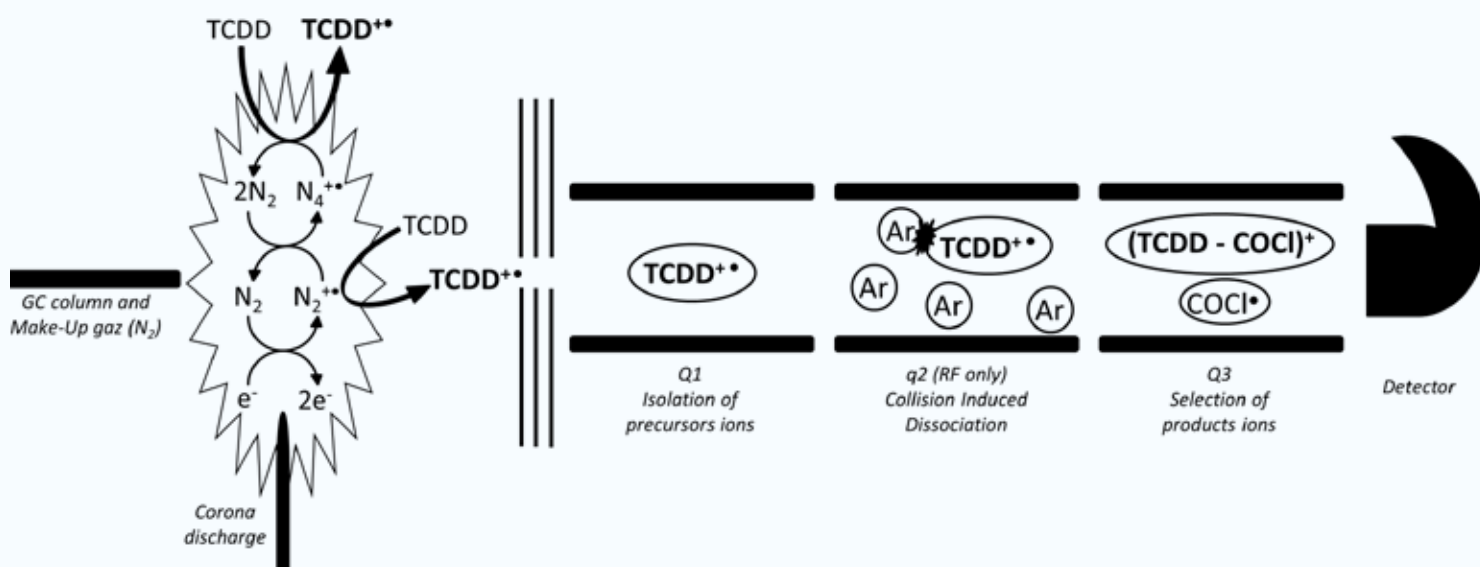


Figure 1 : Analyse de 2,3,7,8-TCDD par APGC-MS/MS

Les performances analytiques, limitées à des injections instrumentales en APCI, sont comparables aux performances obtenues en EI pour la bonne et simple raison que les PCDD/F et les PCB donnent lieu également à d'intenses ions moléculaires par EI. Ce n'est pas le cas de tous les polluants où la balance peut pencher en faveur de l'APCI, notamment pour les insecticides de types pyréthroïdes comme rapporté par Portolés et collaborateurs [4]. La fragmentation intensive de ces pesticides en mode EI pénalise fortement l'approche MS/MS lors du choix des ions précurseurs.

Nous avons mis en évidence dans cet article que la sensibilité du système de détection est cruciale pour ce type d'application analytique. Cependant, les femtogrammes de PCDD/F et de PCB injectés à partir d'une solution d'étalonnage ne correspondent pas à la réalité du terrain. Mesurer en routine les PCDD/F et les PCB dans des échantillons réels est le véritable défi, et cela requiert évidemment le système de détection le plus sensible, mais les étapes d'extraction et de purification préalables à l'injection jouent aussi un rôle crucial. Elles ont un impact sur la qualité et la fiabilité des résultats d'analyse. Les techniques d'APGC-MS/MS ou d'EI-GC-MS/MS ont démontré leurs potentialités sur des échantillons réels de denrées alimentaires, à des niveaux de concentration appropriés, mais la stabilité à long terme et les performances dans les conditions de routine ont encore besoin d'être évaluées pour pouvoir affirmer de manière catégorique que cette nouvelle génération d'instruments remplacera définitivement les instruments à secteurs actuels (HRMS).

## Références:

1. Commission Regulation (EU) No 252/2012 of 21 March 2012 repealing Regulation (EC) No 1883/2006 (OJ L 84, 23.3.2012, p. 1–22)
2. Commission Regulation (EU) No 589/2014 of 2 June 2014 repealing Regulation (EC) No 252/2012 (OJ L 164, 3.6.2014, p. 18–40)
3. Domeño, C., et al., (2012). *Journal of Chromatography A*, 1252(0): 146-154.
4. Porteles T, Mol J.G.J; Sancho J. V., Hernandez F., (2012) *Analytical Chemistry* 84,9802-9810.
5. Geng D, Jogsten IE, Kukucka P, Hagberg J, Roos A, van Bavel B, (2014) *Organohalogen Compd* 76 in press
6. Kotz A, Traag W, Winterhalter H, Malisch R, Dunstan J (2013) *Organohalogen Compd* 75, 678-681
7. Kotz A, Malisch R, Wahl K, Bitomsky N, Adamovic K, Gerteisen I, Leswal S, Schachtele J, Tritschler R, Winterhalter H (2011) *Organohalogen Compd* 73 : 688-691
8. Sandy C, Fürst C, Bernsmann T, Baumesiter D (2011) *Organohalogen Compd* 73: 1370-1371
9. L'Homme B, Scholl G, Eppe G, Focant JF (2014) *Organohalogen compd*, 76 in press

G.Eppe@ulg.ac.be



# Evolution des méthodes de screening pour la recherche des résidus

Philippe Delahaut

CER Groupe - Département Santé, Rue du Point du Jour 8, 6900 Marloie, Belgique

L'objectif d'une méthode de screening est de détecter la présence éventuelle de résidus dans la chaîne de production. L'identification des échantillons positifs doit être rapide avec un minimum d'étapes de purification et d'extraction. Le pourcentage de faux-positifs doit être bas, tandis que l'on ne peut pas avoir de faux-négatifs.

Les méthodes actuelles de screening pour la recherche des résidus sont surtout des dosages immunoenzymatiques de type ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) et des systèmes de type tigelette (*dipstick*) pour les contrôles à l'endroit de production.

Les éléments clefs de ces types de dosage sont l'anticorps ou le récepteur, l'antigène marqué ou non ainsi que le système de détection. C'est en améliorant ces différents éléments que de nouvelles méthodes peuvent être développées.

## a) Anticorps

La plupart des anticorps utilisés pour le diagnostic *in vitro* sont des polyclonaux ou des monoclonaux. Il existe d'autres alternatives telles que les anticorps recombinants, les *nanobodies*, les aptamers, les MIP (*Molecular Imprinted Polymer*) ou les récepteurs pour produire les *ligands* indispensables à la liaison à l'antigène. Les principaux développements dans ce domaine consistent à essayer d'obtenir des *ligands* qui se lient à plusieurs molécules du même groupe afin d'avoir un système multirésidus particulièrement intéressant lors du screening. Actuellement, certains anticorps permettent de reconnaître tous les  $\beta$ -agonistes en un seul dosage. Des kits de dosage pouvant doser toutes les quinolones ou l'ensemble des sulfamides dans un seul test sont également disponibles.

Les récepteurs présentent l'avantage de se lier en fonction d'une activité biologique ou pharmacologique. Des récepteurs capables de se fixer aux molécules des groupes des  $\beta$ -lactames ou des tétracyclines existent déjà. Les développements à venir au niveau des *binders* viseront surtout à produire des réactifs à large spectre avec une bonne affinité.



## b) Modes de détection

La détection de résidus tels que les antibiotiques dans les denrées alimentaires d'origine animale, est souvent assurée par l'utilisation de tests de screening comme les tests d'inhibition microbiologique, les ELISAs ou les tests immuno-chromatographiques (Figure 1). Au cours de la dernière décennie, certains tests ont été améliorés et de nouveaux tests rapides ont été développés en suivant différentes tendances :

- **Rapidité** - Dans un souci de gain de temps, de nouveaux tests ont été développés avec une durée de test de maximum 3 min.
- **Multiplicité** - La plupart des tests rapides détectaient habituellement une seule substance ou seulement des substances appartenant à une seule famille d'antibiotiques (essentiellement les  $\beta$ -lactames). Aujourd'hui, des tests rapides génériques sont disponibles pour la détection de 4 familles d'antibiotiques ou plus.
- **MRL** - La capacité de détection des tests rapides a été améliorée au cours des dernières années et est mieux adaptée aux besoins du marché agro-alimentaire.
- **Température ambiante** - Certains producteurs de kits se sont plus focalisés sur un test pouvant être réalisé à température ambiante de sorte qu'aucun appareil de chauffage ne soit nécessaire.

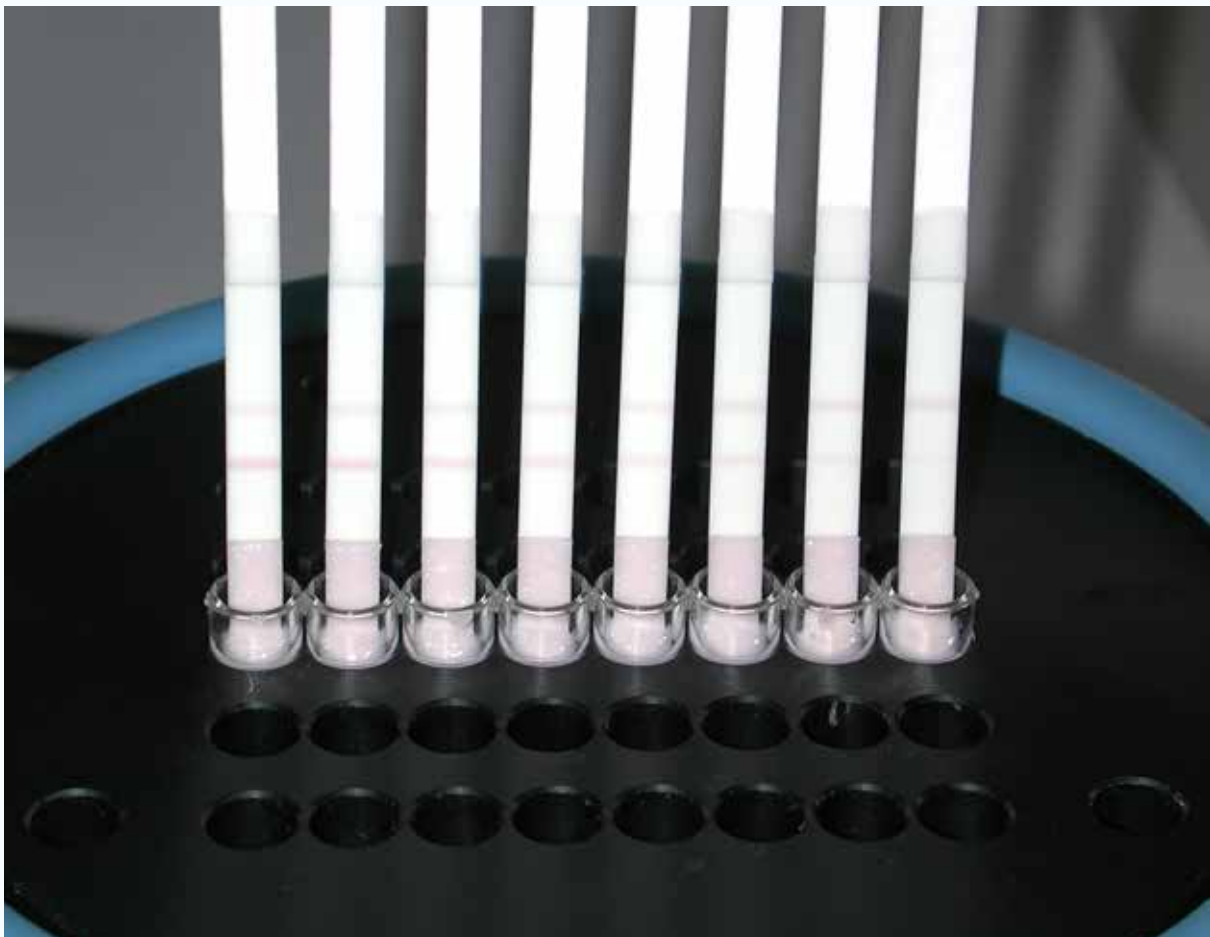


Figure 1: illustration de test immuno-chromatographique

En marge de cette course vers un test immédiat, multiplex, adapté aux seuils de détection officiels et ne nécessitant aucun appareillage, d'autres approches basées sur de nouvelles technologies commencent également à voir le jour. Des technologies telles que la micro-fluidique, la résonance plasmique de surface (RPS), les biosenseurs optiques et les biochips sont déjà ou seront bientôt disponibles pour l'analyse des résidus.

Parmi celles-ci, la **cytométrie de flux** permet de détecter simultanément plusieurs résidus ou contaminants dans les denrées alimentaires. Pour ce faire, on fixe des « binders » spécifiques ou génériques (tels que les anticorps) ainsi que l'haptène à la surface de microparticules fluorescentes. Ces particules peuvent avoir des tailles et des fluorescences différentes.

Ainsi on peut, dans le même dosage, avoir des billes de 4 ou 5 microns ainsi qu'environ 25 intensités de fluorescences différentes générées par des fluorochromes en proportions variables dans chaque bille. A la surface de chaque bille, un haptène différent est fixé. Le *multiplexing* est assuré en multipliant les billes dans le même dosage.

Le principal défi est la production des *binders* et le développement d'une méthode générique d'extraction pour extraire tous les composés avec des caractéristiques physico-chimiques parfois très différentes.

D'un autre côté, le grand avantage par rapport aux ELISAs classiques est le *multiplexing*. Les développements technologiques laissent également entrevoir la possibilité d'utiliser des détecteurs portables avec un haut débit d'analyse.

Actuellement au CER Groupe, dans le cadre d'un projet EUREKA, nous finalisons la mise au point d'un système pour la détection simultanée de 10 familles d'antibiotiques dans la viande.

De très nombreux développements sont apparus ces dernières années dans le domaine des **biosenseurs**.

Le biosenseur est un système analytique qui permet de mesurer un changement de concentration d'une molécule à la surface d'un détecteur. Cette mesure se fait en temps réel sans devoir recourir à des traceurs. Cette technique dont les principaux avantages sont la rapidité, la reproductibilité et l'absence d'interférence avec la matrice, permet de suivre les interactions entre un antigène déterminé et l'anticorps correspondant.

En conclusion, on doit s'attendre à avoir dans les années à venir des méthodes encore plus rapides et fiables pour la détection des résidus. Un élément non négligeable à tenir compte est le coût pour le secteur.

p.delahaut@cergroupe.be



# Workshops & Symposia

**Les formations, destinées aux laboratoires agréés, organisées par l'AFSCA en collaboration avec les laboratoires nationaux de référence se trouvent sur le site web de l'AFSCA ([www.afsca.be](http://www.afsca.be) > Secteurs professionnels > Laboratoires > Séminaires & workshop).**

**Ce tableau est régulièrement actualisé, veuillez donc régulièrement consulter le site web.**

**D'autres workshops et symposia intéressants sont mentionnés ci-dessous.**

Date	Sujet	Lieu	Plus d'info (site web)
13-17.04.2015	IDF/ISO Analytical Week 2015 & Final Optimir scientific and expert meeting	Namur, Belgium	<a href="http://www.idf-iso-analytical-week.org">www.idf-iso-analytical-week.org</a>
20-22.04.2014	10th Conference RME2015 Food Feed Water Analysis Innovations and breakthroughs!	The Netherlands	<a href="http://www.bastiaanse-communication.com/rme2015/">http://www.bastiaanse-communication.com/rme2015/</a>
20-22.04.2015	2015 IAFP European Symposium on Food Safety Calls	Cardiff, Wales	<a href="https://www.foodprotection.org/europeansymposium/">https://www.foodprotection.org/europeansymposium/</a>
25-28.04.2015	25th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases	Copenhagen, Denmark	<a href="http://www.eccmid.org/">http://www.eccmid.org/</a>
21-22.05.2015	AOAC Europe – NMKL – NordVal International Symposium 2015: "Food Labs in Crystal Ball; Future Challenges in Food Analysis"	Stockholm, Sweden	Jointly organised by AOAC Europe, NMKL and NordVal International. <a href="http://www.aoaceurope.com/">http://www.aoaceurope.com/</a>
June 2015	Global Forum on Genetically Modified Wheat		<a href="http://www.bastiaanse-communication.com/html/upcoming.html">http://www.bastiaanse-communication.com/html/upcoming.html</a>
7-11.06.2015	6th Congress of European Microbiologists (FEMS 2015 Congress)	Maastricht, Nederland	<a href="http://fems-microbiology.kenes.com/">http://fems-microbiology.kenes.com/</a>
16-19.06.2015	SASKATOON INTERNATIONAL WORKSHOP on VALIDATION and REGULATORY ANALYSIS	Calgary, Alberta, Canada	<a href="http://www.saskval.ca/">http://www.saskval.ca/</a>
22-24.06.2015	World Congress and Expo on Applied Microbiology	Frankfurt, Germany	<a href="http://www.jmbfs.org/conference/world-congress-and-expo-on-applied-microbiology/">http://www.jmbfs.org/conference/world-congress-and-expo-on-applied-microbiology/</a>
8-12.09.2015	9th International Conference on Predictive Modelling in Foods (ICPMF)	Rio de Janeiro, Brazil	<a href="http://icpmf9.com/">http://icpmf9.com/</a>
15.09.2015	Mass Spectrometry in Food and Feed II	Gent, Belgium	<a href="http://www.voeding.kvcv.be">www.voeding.kvcv.be</a>
8-9.10.2015	20th Conference on Food Microbiology	Brussels, Belgium	<a href="http://www.bsfm.be/">http://www.bsfm.be/</a>
3-6.11.2015	7th International Symposium on Recent Advances in Food Analysis (RAFA 2015)	Prague, Czech Republic	<a href="http://www.rafa2015.eu">www.rafa2015.eu</a>





# Labinfo