



# Labinfo

Publication destinée aux laboratoires de sécurité alimentaire agréés

- 4 Détection d'E. coli shigatoxinogène, STEC, dans l'alimentation : méthodologie et points problématiques
- 9 Spectrométrie de masse à haute résolution
- 15 L'utilité du séquençage complet du génome pour l'investigation des épidémies de pathogènes alimentaires, Salmonella Enteritidis comme cas d'étude
- 19 Denrées alimentaires halal : méthodes d'analyse pour la détection de traces de viande de porc dans les viandes et produits à base de viande
- 22 Analyse d'allergènes alimentaires par LC-MS/MS
- 29 Présence de retardateurs de flamme bromés (RFB), nouveaux ou émergents, dans les denrées alimentaires : état actuel de la législation européenne
- 32 Caractérisation des UGM en utilisant une stratégie de marche chromosomique
- 36 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, Sarah Denayer, Katelijne Dierick, Nadine Botteldoorn, Els Van Pamel, Els Daeseleire, Christof Van Poucke, Véronique Wuyts, Nancy Roosens, Wesley Mattheus, Sophie Bertrand, Kathleen Marchal, Sigrid De Keersmaecker, Rob Margry, Nathalie Gillard, Otto Gaëtan, Philippe Delahaut, Gauthier Eppe, Georges Scholl, Edwin De Pauw, Jean-François Focant, Marie-Alice Fraiture, Herman Philippe et Nina Papazova

### **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,

L'année 2015 touche tout doucement à sa fin. Celle-ci a été chargée au sein de l'AFSCA. Le business plan de notre administrateur délégué a été approuvé par notre ministre de tutelle, le Ministre Willy Borsus. En conséquence, chaque direction générale de l'Agence a pu se lancer dans l'élaboration d'un plan de management afin de concrétiser les objectifs stratégiques du business plan. Cette fois-ci, l'ampleur du défi n'était pas à sous-estimer vu les importantes économies que nous devons réaliser.

Nous aussi, au sein de la direction laboratoires, nous y avons travaillé, conjointement avec les membres du middle management. Le plan de management qui en résulte sera notre fil conducteur pour les prochaines années afin d'améliorer notre fonctionnement.

Ce plan de management peut en fait être séparé en deux grandes parties. La première partie concerne le fonctionnement des 5 laboratoires de l'AFSCA, tandis que la deuxième partie concerne la gestion des laboratoires nationaux de référence et des laboratoires externes.

Dans le cadre de l'un des objectifs, nous souhaitons revoir la collaboration avec les LNR, raison pour laquelle nous souhaitons remettre en question un certain nombre d'éléments. Qu'attendons-nous d'un LNR ? Quelles sont les tâches critiques ? Quels sont les éléments non essentiels mais qui apporteraient une valeur ajoutée ? Quelles sont les attentes d'un LNR par rapport à l'AFSCA ? De quelle manière pouvons-nous améliorer la collaboration ? De quelle manière le LNR peut-il offrir davantage de valeur ajoutée ? Qu'en est-il de la répartition du budget ? Définissons-nous les priorités adéquates ? Sur la base de quels indicateurs pouvons-nous mieux suivre et évaluer les activités du LNR ? Y a-t-il des domaines pour lesquels, à l'heure actuelle, aucun LNR n'est désigné alors que cela serait pourtant souhaitable ? ...

En bref, une multitude de questions. La réponse à ces questions déterminera pour les prochaines années la direction que nous suivrons avec les LNR.

Le fait que les LNR ne sont pas non plus restés les bras croisés en 2015 se reflétera clairement dans les articles de ce numéro de Labinfo. Ils ont entre autres travaillé à de nouvelles méthodes et techniques afin de trouver une réponse aux nouveaux défis.

Je vous souhaite beaucoup de plaisir à la lecture de cette quatorzième édition de Labinfo et vous souhaite d'ores et déjà de joyeuses fêtes et une bonne année.

Bert Matthijs  
Directeur général Laboratoires

# Détection d'*E. coli* shigatoxinogène, STEC, dans l'alimentation : méthodologie et points problématiques

Sarah Denayer, Katelijne Dierick et Nadine Botteldoorn

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

## Introduction

*E. coli* est une bactérie intestinale généralement inoffensive que l'on rencontre chez l'homme et les animaux. Certains types peuvent toutefois s'avérer pathogènes chez l'homme et occasionner des problèmes intestinaux. En fonction de leurs facteurs de virulence et du tableau clinique qu'elles peuvent engendrer, on distingue différents groupes d'*E. coli* pathogènes. Un groupe important est constitué des *E. coli* productrices de shigatoxines, aussi appelées STEC. Le groupe des *E. coli* entérohémorragiques (ECEH) qui peuvent provoquer des diarrhées modérées mais également des diarrhées sanglantes chez l'homme fait partie de ces STEC. Dans 2 à 10% des cas, des complications peuvent survenir, comme le syndrome urémique hémolytique (SUH) qui requiert parfois de recourir à une dialyse rénale.

La gravité d'une infection provoquée par STEC dépend de la possession de facteurs de virulence, comme les shigatoxines (codées par les gènes *stx1* et *stx2*), et d'autres facteurs de virulence qui jouent un rôle lors de l'adhésion et de l'invasion au niveau de l'intestin, comme par exemple l'intimine (codée par *eae*). Outre *E. coli* O157:H7, qui a déjà été retrouvé dans plusieurs foyers et possède des caractéristiques biochimiques spécifiques (sorbitol -), d'autres sérotypes peuvent également provoquer une grave maladie chez l'homme.

En ce qui concerne la détection de ce germe dans les denrées alimentaires, la méthode (ISO/TS 13136:2012) (1) pour la détection de STEC appartenant aux principaux sérotypes chez l'homme (O157, O111, O26, O103 et O145) a été publiée en 2012. Peu après, une directive européenne relative aux STEC dans les germes a été publiée (Règlement (UE) 209/2013) (2) de même qu'un avis de l'EFSA (3) procédant à un classement du risque pour STEC sur base des gènes de virulence et des sérotypes.

## Détection du pathogène *E. coli* ISO/TS 13136:2012

La détection du pathogène *E. coli* selon la méthode ISO/TS 13136:2012 repose sur un screening PCR des principaux gènes de virulence, à savoir *stx* et *eae*, et des gènes associés au top 5 des sérotypes. Après l'obtention d'un résultat PCR pour un échantillon, on essaie d'isoler le germe lors d'une étape suivante. Cela peut se faire à l'aide (ou non) de techniques d'enrichissement spécifique au sérotype comme la séparation immunomagnétique. L'isolement des souches STEC est requise pour confirmer la présence de gènes de virulence dans une même bactérie vivante et donc pour considérer un échantillon comme positif aux STEC.

La méthode comprend donc les étapes suivantes:

- A. Enrichissement de STEC
- B. Screening: Extraction d'ADN et détection PCR (en temps réel) des gènes de virulence et des gènes associés au sérotype
- C. Isolement du germe des échantillons présumés positifs pour STEC et confirmation

## A. Enrichissement

Le choix du milieu d'enrichissement dépend de l'état des bactéries et de la matrice alimentaire à analyser. Il est conseillé d'utiliser de l'eau peptonée tamponnée (EPT) pour les échantillons dans lesquels on s'attend à retrouver des bactéries stressées (ex. produits surgelés) et une faible flore annexe et ce dans un but de revivification des STEC. Pour les échantillons dans lesquels on attend une flore secondaire plus importante, un milieu mTSB avec novobiocine est recommandé tandis que pour le lait et les produits laitiers, il faut utiliser un milieu mTSB avec acriflavine. Les deux composants freinent la croissance des bactéries à Gram positif et ce au profit des germes à Gram négatif dont les STEC. De trop fortes concentrations en novobiocine ont cependant un effet inhibiteur pour les STEC, surtout pour les souches *E. coli* autres que O157. D'autre part, l'utilisation d'EPT pour ces échantillons pourrait induire une croissance limitée des STEC en raison de la compétition avec la flore secondaire, ce qui complique l'isolement dans une phase ultérieure. Cela a été confirmé par une étude scientifique sur les germes et les légumes crus (salade, carottes) mais s'appliquait moins au lait cru, à la viande de bovins et aux écouvillons de carcasses de bovins (IDESTEC RT12/12) (4) (Schéma 1).

Il n'est donc pas évident pour un laboratoire de faire un choix correct du milieu d'enrichissement, celui-ci dépend fortement de la matrice alimentaire à analyser.

a Carottes râpées (*E. coli* O145)

b Lait cru (*E. coli* O26)

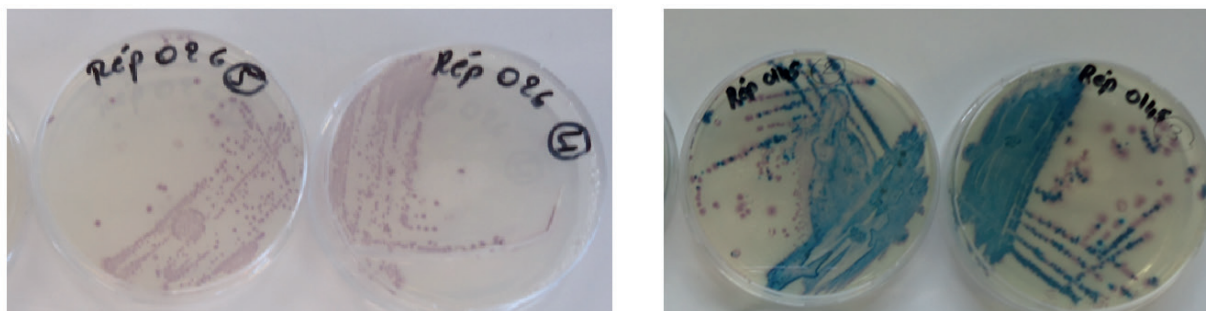


Schéma 1 : (a) Présence de flore secondaire (colonies bleues) sur CHROMagar STEC après isolement de STEC (exemple *E. coli* O145) (colonies violettes) de carottes râpées, mais (b) absence de flore secondaire après isolement de STEC (exemple *E. coli* O26) de lait cru.

## B. Screening: Extraction d'ADN et détection PCR (en temps réel) des gènes de virulence et des gènes associés au sérotype

L'ADN est directement préparé à partir de l'enrichissement à l'aide d'une méthode appropriée pour bactérie à Gram négatif.

Le screening des STEC dans les enrichissements qui suit repose sur la détection de gènes de virulence spécifiques, *stx1*-*stx2* et *eae* avec PCR (en temps réel). Une analyse des gènes associés au sérotype fournit des informations sur le sérotype probable et peut être utilisée pour réaliser un isolement de STEC spécifique au sérotype (voir point C).

Tant la PCR conventionnelle que la PCR en temps réel peuvent être utilisées pour le screening des enrichissements. L'annexe E de la méthode ISO/TS 13136:2012 décrit les séquences d'amorce et les séquences de sonde mais d'autres amorces décrites dans la littérature ou des kits commerciaux peuvent également être utilisés pour autant que la même performance puisse être démontrée. Cette étape de screening ne représente probablement pas un point critique de la méthode (IDESTEC RT 12/12). (4)



### C. Isolement du germe des échantillons présumés positifs pour STEC et confirmation

Afin de confirmer la présence des gènes de virulence dans une même cellule *E. coli* vivante, on essaie d'isoler la souche STEC pour les enrichissements positifs à *stx*. A cet effet, l'enrichissement peut être étalé sur un milieu agar tryptone-bile-glucuronide (TBX), un milieu chromogène spécifique pour l'isolement d'*E. coli*. Ce milieu d'isolement ne permet toutefois pas de distinguer l'*E. coli* commensal de STEC, ce qui complique l'isolement. Alternativement, un autre milieu d'isolement spécifique (chromogène) peut être utilisé si disponible, afin de simplifier l'isolement des STEC des bactéries de fond (ex. CHROMagar™ STEC, ChromID™ EHEC) (Figure 2).

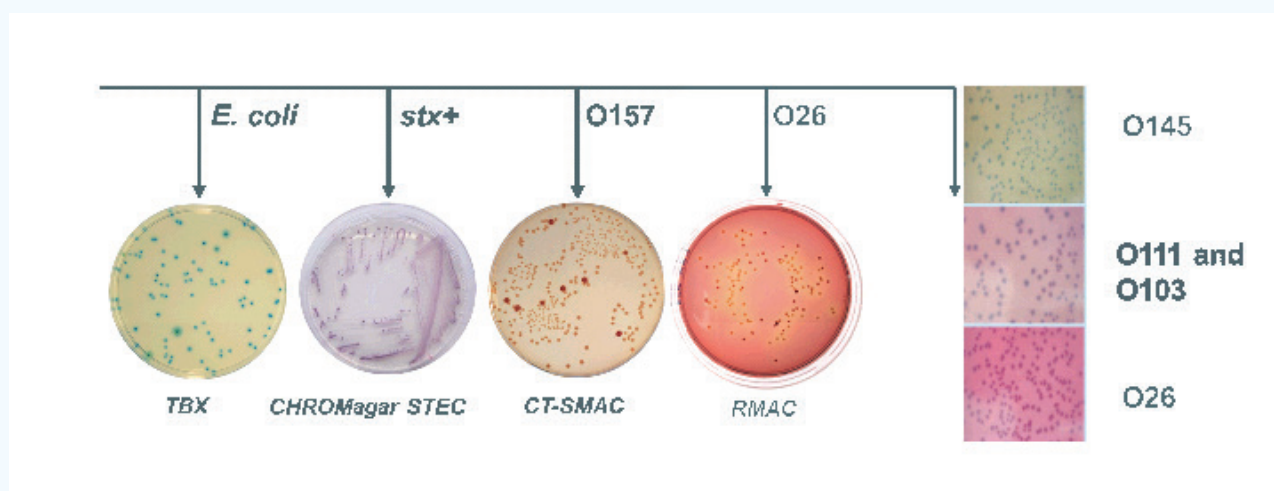


Figure 2 : *E. coli* (STEC) isolement sur TBX, Chromagar™ STEC, CT-SMAC, RMAC et milieu tel que décrit par Possé et al., 2008. (5)

Les résultats du screening des gènes associés au sérotype peuvent également simplifier et orienter le choix du milieu d'isolement. Pour les échantillons positifs au sérotype O157 lors du screening PCR, il est préférable d'utiliser la méthode de référence pour *E. coli* O157 (ISO16654 ou une méthode alternative) pour l'isolement. Pour les échantillons positifs au sérotype O26, il existe un milieu agar MacConkey commercial avec du rhamnose au lieu du lactose (RMAC). D'autre part, les milieux décrits par Possé et ses collaborateurs (2008<sup>5</sup>), qui se basent sur l'utilisation différente du sucre des sérotypes du top 5, peuvent également être utilisés pour l'isolement du germe.

L'étalement sur un milieu d'isolement peut être précédé ou non d'un enrichissement spécifique au sérotype, par exemple au moyen d'une séparation immunomagnétique (avec des particules magnétiques enduites d'anticorps spécifiques au groupe O). On remarque toutefois que cette étape facultative n'est pas suffisamment spécifique pour un certain nombre de sérotypes, ce qui entraîne le maintien d'une grande quantité de flore secondaire et complique l'isolement (Figure 3).

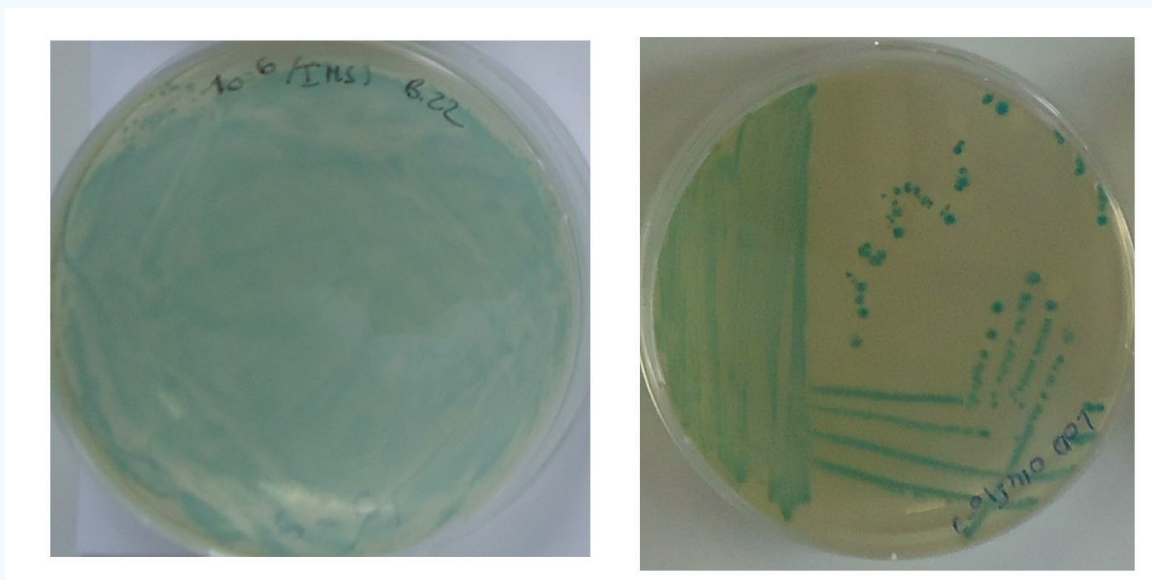


Figure 3 : Isolement d'*E. coli* O145 de carottes (a) avec IMS ou (b) par étalement direct sur TBX

Après étalement sur un milieu d'isolement, jusqu'à 50 colonies qui possèdent les caractéristiques spécifiques à *E. coli* sont examinées plus précisément suivant le milieu d'isolement utilisé. Celles-ci sont inoculées sur nutriment agar (NA) au moyen d'une inoculation par point et sont en même temps inoculées dans une solution aqueuse (échantillon composite de 10 colonies) pour la détection PCR des gènes *stx* et *eae*. Lorsque la détection PCR (temps réel) pour les gènes *stx* et/ou *eae* est positive pour un échantillon composite, toutes les colonies individuelles sont testées afin d'identifier la colonie positive. La plaque NA peut être utilisée à cet effet afin de confirmer l'isolat. Pour finir, le sérotype de la colonie positive est déterminé par PCR (temps réel) ou agglutination.

### Conclusion

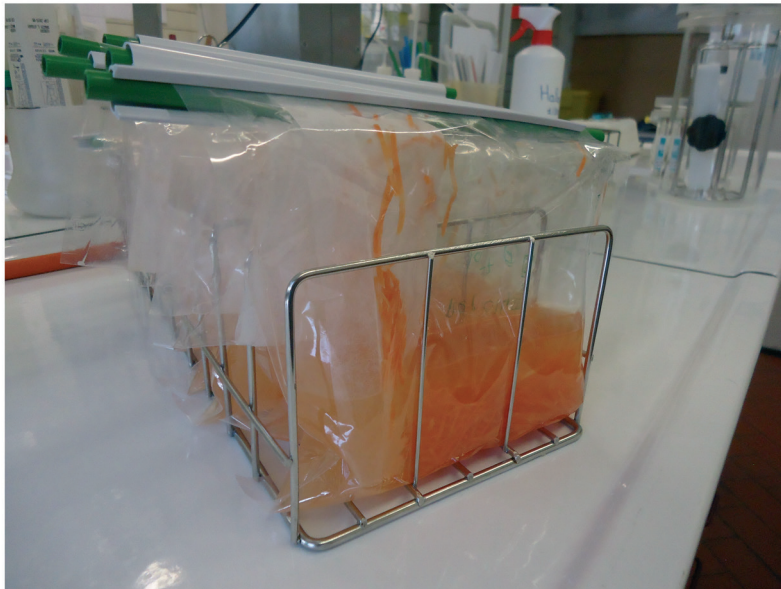
C'est principalement l'isolement et pas tant le screening PCR (en temps réel) des STEC dans un enrichissement qui constitue un point critique de la méthode de détection ISO/TS 13136:2012 de STEC. Lorsqu'un laboratoire souhaite implémenter cette méthode, il doit tenir compte d'un certain nombre de facteurs importants afin de parvenir à une efficacité de détection optimale des STEC. Une étude de validation est dans ce cas très importante, un choix devant être fait tant pour le milieu d'enrichissement que pour le milieu d'isolement. Ce choix dépend de la nature des échantillons que le laboratoire recevra pour analyse étant donné que la matrice alimentaire et la flore secondaire présente ont un impact important sur la possibilité de croissance et d'isolement des STEC. Étant donné que la méthode ISO/TS 13136:2012 est constituée de deux grandes parties, à savoir la détection du pathogène via PCR (en temps réel) et - si positive aux critères préétablis - l'isolement du germe, une approche modulaire lors de la validation est requise.



## Références :

1. ISO/TS 13136 :2012. Microbiology of food and animal feed -- Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens -- Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups
2. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ); Scientific Opinion on VTEC-seropathotype and scientific criteria regarding pathogenicity assessment. EFSA Journal 2013;11(4):3138. [106 pp.] doi:10.2903/j.efsa.2013.3138. Available online: [www.efsa.europa.eu/efsajournal](http://www.efsa.europa.eu/efsajournal)
3. Règlement (UE) 209/2013 de la Commission du 11 mars 2013 modifiant le règlement (CE) n° 2073/2005 en ce qui concerne les critères microbiologiques applicables aux germes et les règles d'échantillonnage applicables aux carcasses de volailles et à la viande fraîche de volaille. (2013) Journal officiel de l'Union européenne L68/19
4. Identification approfondie de la shiga-toxine *Escherichia coli* (STEC) pathogène pour l'homme en Belgique. (IDESTEC RT 12/12)
5. Possé B, De Zutter L, Heyndrickx M, Herman L. (2008). Novel differential and confirmation plating media for Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O26, O103, O111, O145 and sorbitol-positive and -negative O157. FEMS Microbiol Lett. 282(1):124-31

Sarah.Denayer@wiv-isp.be





# Spectrométrie de masse à haute résolution

*Els Van Pamel, Els Daeseleire en Christof Van Poucke*

*Instituut voor Landbouw- en Visserijonderzoek / Institute for Agricultural and Fisheries Research*

*Eenheid Technologie en Voeding - Voedselveiligheid / Technology and Food Science Unit - Food Safety*

*Brusselsesteenweg 370, 9090 Melle*

## Introduction aux spectromètres de masse à haute résolution (HRMS)

Les techniques analytiques susceptibles de fournir des informations qualitatives (quoi) et/ou quantitatives (combien) sur la composition d'échantillons biologiques sont d'une importance cruciale dans de nombreux secteurs, parmi lesquels l'industrie alimentaire. Le succès de telles techniques est déterminé par des paramètres tels que la sensibilité, la sélectivité, la robustesse, la justesse et la fidélité, la vitesse et le coût par analyse. Les techniques basées sur la chromatographie- spectrométrie de masse telles que la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) et la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse ("liquid chromatography-mass spectrometry", LC-MS) jouent ici un rôle important. Cet article met essentiellement l'accent sur l'évolution, au sein de la spectrométrie de masse, vers des systèmes à haute résolution ("high resolution mass spectrometers", HRMS). Ces dernières années, on observe au sein du monde analytique une évolution progressive des spectromètres de masse à basse résolution (tels que les simples quadripôles et les triples quadripôles/en tandem) vers des appareils à haute résolution caractérisés par une grande capacité de différenciation (c.-à-d. avec un détecteur capable de différencier deux ions dont les masses diffèrent peu (rapport masse/charge)), une précision de masse et une gamme dynamique. Parmi les appareils à haute résolution disponibles sur le marché, citons les spectromètres de masse à secteur magnétique, à temps de vol (TOF), à résonance cyclotronique ionique à transformée de Fourier (FTICR) et l'Orbitrap à transformée de Fourier. Pour une description plus détaillée de chacun de ces types de spectromètres de masse, nous vous renvoyons au Labinfo N° 12 (juillet 2014, "Dépistage des mycotoxines" par Bart Huybrechts). L'article récapitulatif de Xian et al. (2012) traite également plus en détail de ces différents types de spectromètres de masse ainsi que de leurs évolutions récentes. Outre ces types d'appareils de base, on trouve également des appareils hybrides sur le marché, tels que le quadripôle-TOF (QTOF) et les configurations trappe linéaire quadripolaire (LTQ)-orbitrap. De tels appareils hybrides combinent plusieurs types de spectromètres de masse. Cela augmente considérablement les possibilités d'analyse vu qu'ils fournissent des informations de spectrométrie de masse plus diversifiées. Par exemple, en plus de permettre d'obtenir la masse précise de l'analyte-cible (ion précurseur ou ion parent), ces spectromètres de masse hybrides permettent également de fragmenter cet ion précurseur (au sein d'une même analyse) et de déterminer la masse précise de ces ions-fragments (ou ions filles) (MS/MS, voire même MS<sup>n</sup>). Dans l'article de Liang et al. (2011), on retrouve un aperçu des types de base et des types hybrides de tels appareils à haute résolution, et de leur performance. La précision de masse, la résolution, la sensibilité de détection, la rapidité d'enregistrement des données et la possibilité d'une analyse MS/MS et MS multiphase (MS<sup>n</sup>) sont notamment comparées entre les différents types.



## Caractéristiques des HRMS

Bien que leur nom laisse supposer que leur haute résolution constitue la principale caractéristique de tels appareils, autrement dit leur capacité à différencier le mieux possible des pics proches les uns des autres dans le spectre (correspondant à un rapport masse/charge différent), il est à noter que leur précision de masse est un aspect tout aussi important, c'est-à-dire leur capacité à déterminer le plus précisément possible la masse des composants. La performance des appareils HRMS est exprimée en termes de "pouvoir de résolution" et se situe – en fonction du type d'appareil à haute résolution – dans l'ordre de grandeur  $>10.000 - 100.000$  voire plus dans le cas d'appareils à ultra haute résolution. Ce qui est considérablement plus élevé comparé aux valeurs  $1.000 - 2.000$  des appareils quadripolaires. En ce qui concerne la précision de masse, elle est généralement exprimée en parts par million (ppm) et, suivant la configuration, se situe entre  $<1$  et  $5$  ppm. Une précision de masse suffisante contribue à une réduction du nombre de compositions élémentaires (formules structurales) possibles pour une molécule au sein d'une certaine tolérance de masse, ce qui simplifie l'interprétation des données (Holčapek et al. 2010) et permet par exemple d'identifier de nouveaux composants et/ou des composants inconnus.

### « Ciblé » ou « non ciblé » ?

Un avantage important des spectromètres de masse à haute résolution est la possibilité de travailler aussi bien en mode ciblé ("targeted") que non ciblé ("untargeted"). Le mode ciblé implique une analyse ciblée de la présence/absence de composants connus (liste restrictive) dans un échantillon et la possibilité de déterminer la concentration de ceux-ci à l'aide d'une droite ou d'une courbe d'étalonnage sur base de l'étalon disponible, que ce soit dans la matrice ou non. Bien que la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) soit souvent la méthode la plus utilisée à cet effet (en raison de sa haute sensibilité et sélectivité tout en restant rentable), les spectromètres de masse à haute résolution ont eux aussi leurs mérites dans ce domaine. Cependant, c'est plutôt l'approche «non ciblée» qui caractérise les HRMS. Elle permet, au cours (d'une partie) de l'analyse d'un échantillon, de visualiser une large plage de masses en continu, ce qui nous fournit ainsi un profil total (c.-à-d. une analyse "full scan"). Une telle approche ne requiert donc pas de connaissances préalables (ou de connaissances *a priori*) sur le(s) composant(s) au(x)quel(s) on s'intéresse (p.ex. une classe de substances donnée). Elle permet donc de détecter, au sein d'une même classe de composants (p.ex. stéroïdes), un nombre quasiment illimité de composants différents, mais peut également le faire pour plusieurs classes différentes de composants au cours d'un même run analytique (p.ex. stéroïdes et coccidiostatiques).

Si on essaie d'identifier des molécules "inconnues" suivant une approche générale non ciblée, les spectres de masse ou modèles de pics obtenus seront analysés par un logiciel (voir Figure 1). Il en ressort une liste des compositions élémentaires ou formules structurales possibles. On peut ensuite commencer une recherche dans la banque de données pour parvenir à une liste réduite d'identifications possibles ("hits") voire, dans le meilleur des cas, à une éventuelle identification. Des banques de données telles que PubChem, Chempidier, KEGG, ... peuvent être utilisées à cet effet. C'est alors à l'analyste lui-même de cerner le candidat le plus probable parmi la liste des composants possibles proposés, et ce sur base d'informations supplémentaires. Celles-ci peuvent se cacher dans les données de fragmentation (MS/MS ou  $MS^n$ ). En effet, comme déjà mentionné ci-avant, il est possible avec les appareils hybrides de générer des données  $MS^n$  en plus des données full scan. Cela signifie concrètement qu'en plus des informations sur les molécules mères, on peut également obtenir des données de spectrométrie de masse sur les ions-fragments (ions filles) de ces précurseurs (ions mères). Cela augmente considérablement la capacité d'identification, ou probabilité de retrouver le bon composant. En outre, les propriétés chimiques telles que la polarité des structures proposées peuvent nous fournir une indication sur la plausibilité d'un candidat, ce sur base de son comportement à l'élution (c.-à-d. le temps dont il a besoin pour parcourir la colonne chromatographique). Les "sept règles d'or" telles que décrites par Kind and Fiehn (2007) peuvent ici aussi s'avérer utiles.

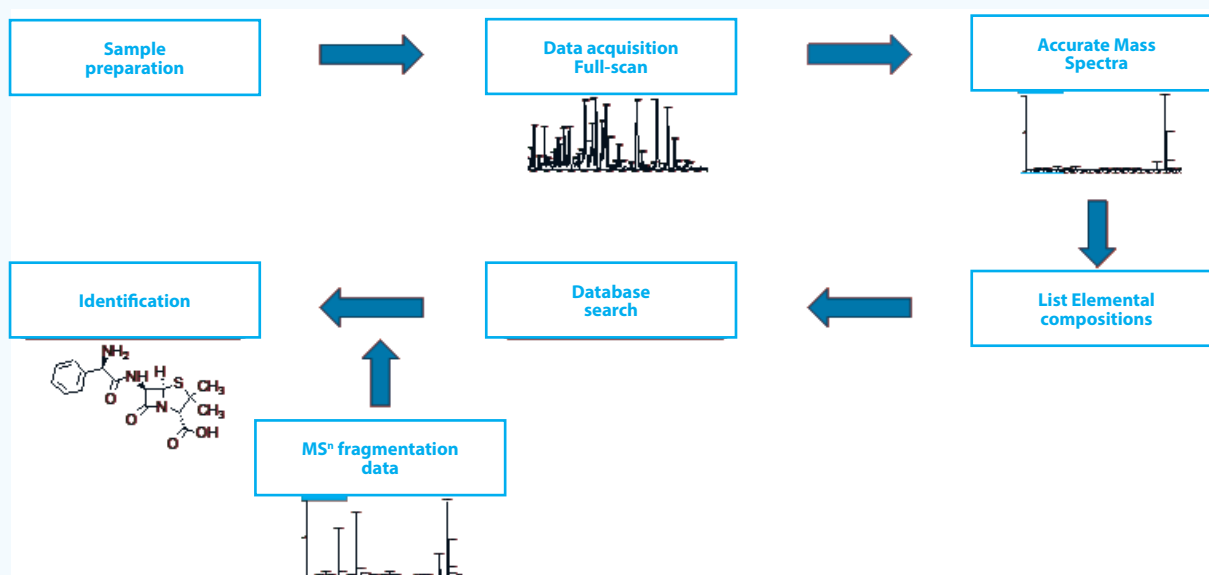


Figure 1: Aperçu du workflow lors d'analyses non ciblées pour l'identification de substances inconnues

Lors d'une approche «non ciblée», il se peut également que l'on ne soit pas intéressé de prime abord par le fait de connaître l'identité des différents composants proprement dite, mais que l'on souhaite comparer entre différents groupes d'échantillons les profils (ou modèles de pics) obtenus lors des analyses "full scan". Par exemple, il se peut que des chercheurs veuillent étudier l'influence de certaines circonstances/conditions ou de certains traitements sur la composition de leur matériel biologique (p.ex. changements dans certaines classes de composant) ou que l'on veuille vérifier l'authenticité de certains produits alimentaires (p.ex. huile d'olive frelatée). Dans le cas de telles demandes d'analyse, les profils générés seront analysés statistiquement à l'aide de logiciels. Les méthodes de classification multivariées, telles que la «Principal Component Analysis» (PCA, analyse en composantes principales) et la «Partial Least Squares Analysis» (PLS, analyse des moindres carrés partiels), ou l'analyse de groupements peuvent être employées à cet effet. Sans trop entrer dans les détails théoriques de telles approches métabolomiques, on peut dire que ces techniques aident à identifier les marqueurs/composants qui contribuent à la variation majeure entre séries de données (traitements / conditions) ; en d'autres termes, quels sont les composants modifiés (p.ex. disparition ou changement de vitesse) et dans quelles circonstances. Ces marqueurs peuvent alors éventuellement être identifiés via une recherche dans les banques de données. Bien que la haute précision de masse des appareils HRMS en mode «non ciblé» soit indispensable et indéniable, il faut tout de même s'assurer que cela reste un processus ambitieux afin d'identifier les "inconnues" de manière univoque. Et bien que les informations de fragmentation obtenues par HRMS soient extrêmement utiles, il faudra toujours revenir à la résonance magnétique nucléaire (RMN) pour parvenir à clarifier la structure de composants tout à fait inconnus.



## Injecter maintenant, analyser plus tard ?

Un aspect supplémentaire qui s'ajoute aux atouts des HRMS est la possibilité d'une analyse rétrospective des données, grâce à l'approche "non ciblée/full scan". Des données enregistrées antérieurement peuvent en effet être ré-analysées à un moment ultérieur (*a posteriori*) au moyen d'un logiciel, ce qui permet de vérifier si, au moment de l'enregistrement des données, des composants (alors encore inconnus) étaient déjà présents ou non dans l'échantillon. Voilà donc le principe "injecter maintenant, analyser plus tard", qui peut s'avérer particulièrement intéressant dans le monde du dopage ou des résidus vétérinaires, par exemple.

## "Mobilité des ions", une troisième dimension...

Dans le domaine de la HRMS, la séparation sur base de la mobilité des ions ("ion mobility separation", IMS) fait aujourd'hui de plus en plus l'objet d'attention. L'article récapitulatif de Kanu *et al.* (2008) présente un résumé des différents types d'IMS ainsi que de ses avantages, et décrit le couplage de l'IMS avec la MS pour les spectromètres de masse TOF, quadripôles, piège à ions et FTICR. Le couplage de l'IMS avec la MS fait en sorte que, d'une part, les ions en phase gazeuse peuvent être séparés sur base de leur rapport taille/charge et de leurs interactions avec un gaz tampon et, d'autre part, qu'ils peuvent être séparés par la MS sur base de leur rapport masse/charge. L'IMS donne lieu à une dimension supplémentaire, traduite en temps de dérive, qui à son tour peut être converti en la section efficace de collision de la molécule ("collision cross section", CCS), pour ainsi dire la dimension 3D sur base de la taille de la molécule. On parle dès lors d'une séparation multi-dimensionnelle qui donne la possibilité de séparer les isomères, isobares et conformères les uns des autres, ainsi que de réduire le bruit chimique ("chemical noise"). L'IMS-MS est, par conséquent, une technique analytique puissante qui permet de séparer des composants qui se ressemblent, même très fortement, dans des échantillons complexes, tout en réduisant le risque de résultats faussement négatifs et faussement positifs. Cette technique est appliquée dans différents domaines tels que la protéomique, la glycomique et la métabolomique (Kanun *et al.* 2008).

## "-OMIQUE"

Le large éventail d'applications possibles des spectromètres de masse à haute résolution, depuis l'identification de composants et la clarification de leur structure jusqu'à l'analyse de composants cibles, ainsi que l'immense diversité de composants biologiques pouvant être analysés ensemble (c.-à-d. multi-analytes) (médicaments, métabolites, composants organiques, protéines (et modifications), peptides, lipides, glycoconjugués et autres composants biologiques) ont contribué à leurs succès dans le monde des sciences portant le suffixe "-OMIQUE" (protéomique, métabolomique, lipidomique, ...). Des exemples d'applications HRMS dans le domaine de la sécurité alimentaire sont décrits dans le Volume 28 de la publication «Food Additives & Contaminants Part A: Chemistry of High Resolution Mass Spectrometry to Food Safety». Nous allons maintenant parler brièvement de l'évolution vers la HRMS dans le monde des analyses de résidus vétérinaires.

## La HRMS dans le monde des résidus vétérinaires

Cela fait déjà quelques décennies que, dans le cadre de la sécurité alimentaire, une législation européenne est en vigueur concernant les composants chimiques qui tombent sous la dénomination de «médicaments vétérinaires». Font par exemple partie de ce groupe, les médicaments antimicrobiens tels que les antibiotiques et les médicaments stimulateurs de croissance, comme les stéroïdes et les  $\beta$ -agonistes. Cela fait donc des années que l'on investit dans le développement et la validation de méthodes d'analyse permettant de détecter les résidus et/ou métabolites de tels médicaments dans différents types de matrices alimentaires/d'aliments pour animaux et de matrices biologiques. À côté des méthodes de screening rapide traditionnelles permettant de différencier les échantillons suspects des échantillons négatifs (c.-à-d. conformes), l'accent est mis aujourd'hui sur la spectrométrie de masse en tant que méthode de confirmation pour une identification et/ou quantification incontestable (en d'autres mots : quelle quantité de quel résidu (de métabolite) est présente dans un échantillon). Pour l'analyse «ciblée» de différents résidus de médicaments vétérinaires au cours d'une même analyse (c.-à-d. méthodes multi-résidus), les spectromètres de masse les plus fréquemment utilisés sont encore les triples quadripôles/en tandem à basse résolution (QqQ). Cependant, la haute résolution et la précision de masse, l'approche «*non a priori*», l'aspect rétrospectif et la possibilité d'une MS<sup>n</sup> font que l'on observe depuis peu une tendance vers une utilisation accrue des spectromètres de masse à haute résolution, aussi bien dans le cadre de l'approche «ciblée» que «non ciblée», pour des échantillons souvent complexes (pour autant que son prix plus élevé en permette l'introduction dans les laboratoires de routine). La HRMS permet également une analyse du point de vue de substances qui n'étaient auparavant pas couvertes par les méthodes «ciblées», ou de rechercher de nouveaux biomarqueurs (Le Bizec *et al.* 2009). Mais comment peut-on vérifier l'efficacité d'une méthode à détecter des résidus de médicaments vétérinaires ou de métabolites de ceux-ci ? Les directives techniques en matière de caractéristiques de performance, de limites et de critères auxquels de telles méthodes doivent satisfaire, sont décrites dans la Décision 2002/657/CE. Cette Décision européenne introduit également le concept de points d'identification (PI) et de rapports ioniques pour les méthodes de confirmation par spectrométrie de masse. Ceci afin de garantir une identification incontestable (et donc de limiter le plus possible le risque de résultats erronés). Ainsi, un minimum de 4 PI est requis pour les substances du groupe A (substances non autorisées et substances ayant un effet anabolisant), tandis que pour celles du groupe B (médicaments vétérinaires et contaminants), un score minimal de 3 PI est prévu. La rubrique «Critères de performance et autres exigences applicables à la détection par spectrométrie de masse» décrit combien de PI sont obtenus par ion pour les méthodes utilisant la HRMS (que ce soit ou non avec la HRMS<sup>n</sup>). Il est également mentionné qu'en HRMS, la résolution doit normalement être supérieure à 10.000 pour toute la plage de masse (avec une vallée de 10 %).

Toutefois, avec les évolutions récentes sur le plan de la technologie (et tout particulièrement en ce qui concerne la HRMS), il conviendrait de réévaluer l'adéquation des directives actuelles données dans la Décision précitée. Des aspects tels que la résolution et la précision de masse, l'absence de bruit mesurable, la dimension supplémentaire de l'IMS et d'autres aspects encore, doivent ici être pris en considération. La question qui s'impose dès lors est de savoir si les critères de performance applicables aux méthodes d'analyse décrits dans la Décision 2002/657/CE devraient être revus dans le contexte des développements technologiques les plus récents. C'est dans ce cadre que le RIKILT Wageningen UR coordonne actuellement un projet ciblé sur la formulation de critères de performance révisés. Une étude de validation est en cours, qui englobe les différentes techniques et les différents laboratoires de par le monde afin de recueillir des données scientifiquement fondées pour évaluer l'adéquation des critères de performance présupposés.



## Un grand pas en avant mais pas encore la fin du tunnel

Nous pouvons en conclure que, même si les spectromètres de masse les plus récents disponibles sur le marché contribuent à un potentiel d'analyse immense de très haute qualité, et que le principe "dilute-and-shoot" peut en théorie être appliqué, il s'avère dans la pratique qu'un échantillonnage correct, une bonne préparation / purification de l'échantillon et une séparation chromatographique efficace restent indispensables pour obtenir de bons résultats d'analyse. Ce ne sont donc pas uniquement les nouveaux développements dans le monde de la HRMS qui sont importants, mais aussi ceux dans le domaine de la chromatographie (UHPLC, LC bidimensionnelle), des logiciels d'analyse de données, etc. En outre, l'intérêt que peut représenter la HRMS se révèle bien souvent tout autant un inconvénient, notamment en raison du fait que la masse de données qu'elle génère induit également une analyse complexe de ces données qui réclame beaucoup de temps. En d'autres termes : la HRMS nous permet de quasiment tout voir, mais avec quelle précision ? Le coût de la HRMS est un autre facteur qui empêche son introduction systématique dans les laboratoires de routine.

L'utilisation de la HRMS dans le monde des résidus n'a donc pas fini de faire parler d'elle. Des discussions et des études approfondies seront encore nécessaires à propos d'aspects tels que la validation des méthodes et les critères d'identification en HRMS.

### Références :

- 1 Décision de la Commission du 12 août 2002 portant modalités d'application de la directive 96/23/CE du Conseil en ce qui concerne les performances des méthodes d'analyse et l'interprétation des résultats (2002/657/CE).
- 2 Holčápek M., Jirsko R., Lsa M. (2010) Basic rules for the interpretation of atmospheric pressure ionization mass spectra of small molecules. *J. Chrom. A*, 1217, 3908-3921.
- 3 Kanu A.B., Dwivedi P., Tam M., Matz L., and Hill H.H. (2008) Ion mobility-mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, 43, 1-22.
- 4 Kind T., and Fiehn O. (2007) Seven Golden Rules for heuristic filtering of molecular formulas obtained by accurate mass spectrometry. *BMC Bioinformatics*, 8, 105-124.
- 5 Le Bizec B., Pinel G., and Antignac J.-P. (2009) Options for veterinary drug analysis using mass spectrometry. *J. Chrom. A*, 1216, 8016-8034.
- 6 Liang Y., Wang G., Xie L., and Sheng L. (2011) Recent development in Liquid Chromatography/Mass Spectrometry and Emerging Technologies for Metabolite Identification. *Curr. Drug Metab.*, 12, 329-344.
- 7 Xian F., Hendrickson C.L., and Marshall A.G. (2012) High Resolution Mass Spectrometry. *Anal. Chem.*, 84, 708-719.

els.vanpamel@ilvo.vlaanderen.be

# L'utilité du séquençage complet du génome pour l'investigation des épidémies de pathogènes alimentaires, *Salmonella Enteritidis* comme cas d'étude

Véronique Wuyts<sup>1,2,3</sup>, Sarah Denayer<sup>4</sup>, Nancy H.C. Roosens<sup>1</sup>, Wesley Mattheus<sup>5</sup>, Sophie Bertrand<sup>5</sup>, Kathleen Marchal<sup>3,6</sup>, Katelijne Dierick<sup>4</sup>, Sigrid C.J. De Keersmaecker<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Plateform Biotechnologie et Biologie Moléculaire, Institut Scientifique de Santé Publique (WIV-ISP), Bruxelles, Belgique

<sup>2</sup>Department of Microbial and Molecular Systems, Centre of Microbial and Plant Genetics, KU Leuven, Leuven, Belgium

<sup>3</sup>Department of Plant Biotechnology and Bioinformatics, Ghent University, Ghent, Belgium

<sup>4</sup>Laboratoire National de Référence Toxi-Infections Alimentaires (LNR-TIA) et LNR Salmonelle dans l'alimentation, Pathogènes Alimentaires, Institut Scientifique de Santé Publique (WIV-ISP), Bruxelles, Belgique

<sup>5</sup>Centre National de Référence Salmonella et Shigella (CNRSS), Maladies Bactériennes, Institut Scientifique de Santé Publique (WIV-ISP), Bruxelles, Belgique

<sup>6</sup>Department of Information Technology, Ghent University, IMinds, Ghent, Belgium

Les investigations classiques des épidémies d'origine alimentaire consistent en la collecte d'échantillons de cas humains, dans des nombreux cas via les selles, l'interrogation des cas humains par un questionnaire standard pour identifier une source alimentaire commune et l'échantillonnage de la nourriture soupçonnée. L'information épidémiologique collectée et les échantillons alimentaires et/ou humains sont envoyés au Laboratoire National de Référence Toxi-Infections Alimentaires (LNR-TIA) pour la détection, l'isolement et l'identification du pathogène d'origine alimentaire afin de définir la source de l'épidémie et par la suite être en mesure de contrôler l'épidémie aussi vite que possible. Généralement, des caractérisations plus en avant, ou « *fingerprinting* », du pathogène permettent de faire un lien fort entre l'isolat des cas humains et celui de la nourriture suspectée ou d'identifier d'autres cas humains liés à la consommation de la même nourriture. Le dernier point est important pour des épidémies avec une distribution géographique dispersée de cas humains. Cette caractérisation consiste généralement en le (sous)typage, souvent au travers de techniques différentes, et de tests de susceptibilité antimicrobienne.

Cependant, les méthodes de caractérisation classiques ne montrent pas toujours le profil 'fingerprint' complet de la souche de l'épidémie, comme cela a été clairement illustré par l'épidémie allemande d'*Escherichia coli* en 2011. Le typage traditionnel de séquençage multi-locus (MLST) basé sur 7 gènes constitutifs montre une étroite relation entre la souche de l'épidémie 2011 et l'historique souche *E. coli* allemande lié au syndrome hémolytique et urémique (SHU). Le séquençage complet du génome (WGS) cependant, montre que la souche de l'épidémie et la souche pathogénique historique d'*E. coli* diffèrent en leur teneur de plasmide et gène chromosomique, et par la même révèle un distinct potentiel de virulence [1]. Ceci démontre que le WGS peut fournir des informations importantes sur les nouveaux pathogènes émergents pour leur traitement ou pour répondre à des besoins de méthodes spécifiques de détection.



Puisque le WGS est postulé comme la méthode universelle et avec une résolution ultime de (sous)typage, celui-ci est assumé être une technique opportune pour l'investigation des épidémies. Pour le séquençage complet du génome des bactéries pathogènes, différentes plateformes de séquençage de nouvelle génération (NGS) peuvent être utilisées pour générer des données. Actuellement, une des questions les plus urgentes est l'analyse des données WGS, consistant en des millions de courts fragments de séquence de lectures ou « reads », pour lesquels une puissance informatique substantielle et des bio-informaticiens sont nécessaires. Ces ressources ne sont typiquement pas présentes dans la moyenne des LNR/CNR. En analogie avec les méthodes traditionnelles de caractérisation, les pathogènes peuvent être caractérisés avec le WGS en se basant sur leur contenu génétique, e.g. pour trouver des gènes de virulence ou de résistance antimicrobienne. En outre, ils peuvent être « fingerprinté » pour identifier le lien entre différents isolats. Pour ceci, deux WGS workflows sont suggérés. Un workflow commence avec l'assemblage *de novo* de ces "reads", après lequel un type de séquence est assigné au travers d'une analyse basée sur les allèles, aussi appelée génome complet MLST. Pour ce genre d'analyse, les schémas de typage et les banques de données internationales, auxquelles les allèles des isolats d'une épidémie peuvent être comparés, ont besoins d'être établis pour chaque espèce pathogénique. Comme les schémas de génome complet MLST et banques de données sont, à l'heure actuelle, non disponibles pour la plupart des pathogènes, un autre workflow est couramment utilisé. Dans ce workflow, les polymorphismes mononucléotidiques (SNPs) sont identifiés après cartographie des « reads » sur un génome de référence. Pour chacun des deux workflows, des bio-informaticiens qualifiés sont nécessaires pour le développement de pipelines d'analyse faciles à utiliser.

En ce moment, des recherches WGS rétrospectives sont réalisées pour estimer la diversité génétique au sein d'épidémies définies et entre les isolats des épidémies et les souches circulantes en bruit de fond. Ceci peut aider dans l'interprétation des données d'épidémies futures. Dans ce contexte, en avril et en mai 2014, le LNR-TIA (Institut Scientifique de Santé Publique (WIV-ISP)) a investigué deux épidémies de *Salmonella* géographiquement distinctes, une en Flandre et une en Wallonie. Comme pour les deux épidémies à la fois les isolats alimentaires et humains étaient disponibles, ces épidémies ont été utilisées comme cas d'étude pour l'investigation rétrospective des épidémies par WGS, en collaboration avec la Plateforme Biotechnologie et Biologie Moléculaire (WIV-ISP).

Les méthodes de caractérisation classiques pour *Salmonella*, nommément le sérotypage, le typage par phage et le « *multiple-locus variable-number of tandem repeats analysis* » (MLVA), ont révélés que les épidémies ont été causées par *Salmonella* Enteritidis avec le même type de phage et le même profil MLVA, à l'exception d'un isolat humain qui montre un type de phage variant. Basé sur ces résultats et les investigations épidémiologiques, l'épidémie flamande a pu être liée à une mousse au chocolat préparée avec des œufs frais non-commerciaux et l'épidémie wallonne a aussi pu être liée à des œufs frais non-commerciaux, qui ont été consommés via un tiramisu. Cependant, les épidémies pouvaient seulement être distinguées sur base de leurs localisations séparées. Le WGS a été réalisé par NGS sur six isolats alimentaires et humains. L'analyse des données WGS a été réalisée avec un software et des outils qui tournent sous Windows 7, en vue de l'applicabilité et la faisabilité du WGS au sein d'un environnement d'experts non-bioinformaticiens. Les "reads" WGS ont été téléchargées sur le serveur "CSI Phylogeny" [2] du centre « Center for Genomic Epidemiology for SNP analysis ». Ceci a résulté en ~52 différences de SNPs entre les deux épidémies et 0 à 2 différences de SNPs à l'intérieur de chaque épidémie. Un arbre phylogénétique est présenté en Figure 1, faisant clairement la distinction entre les isolats de chaque épidémie, tout en montrant un lien clair entre l'isolat alimentaire et humain à l'intérieur de chaque épidémie. Un typage additionnel a été réalisé en téléchargeant les contigs assemblés *de novo* (construit avec un software commercial d'analyse de données, facile à utiliser, i.e. CLC Genomics Workbench) sur le serveur MLST [3], ResFinder [4] et PlasmidFinder [5]. Le serveur MLST, basé sur le système classique MLST des 7 gènes constitutifs, a assigné le même type de séquence aux 6 isolats. Avec ResFinder aucun gène de résistance n'a pu être découvert à l'exception du gène *bla*<sub>TEM</sub> dans l'isolat humain avec le type de phage variant. En utilisant PlasmidFinder on a démontré que cet isolat présente aussi un second plasmide, tandis que pour tous les autres isolats, seul un plasmide a été trouvé. Le test de sensibilité antimicrobienne, utilisant des concentrations inhibitrices minimales, a confirmé phénotypiquement les résultats de ResFinder. De plus, l'analyse visuelle avec BRIG [6] a révélé que le gène *bla*<sub>TEM</sub> est présent sur le plasmide supplémentaire.



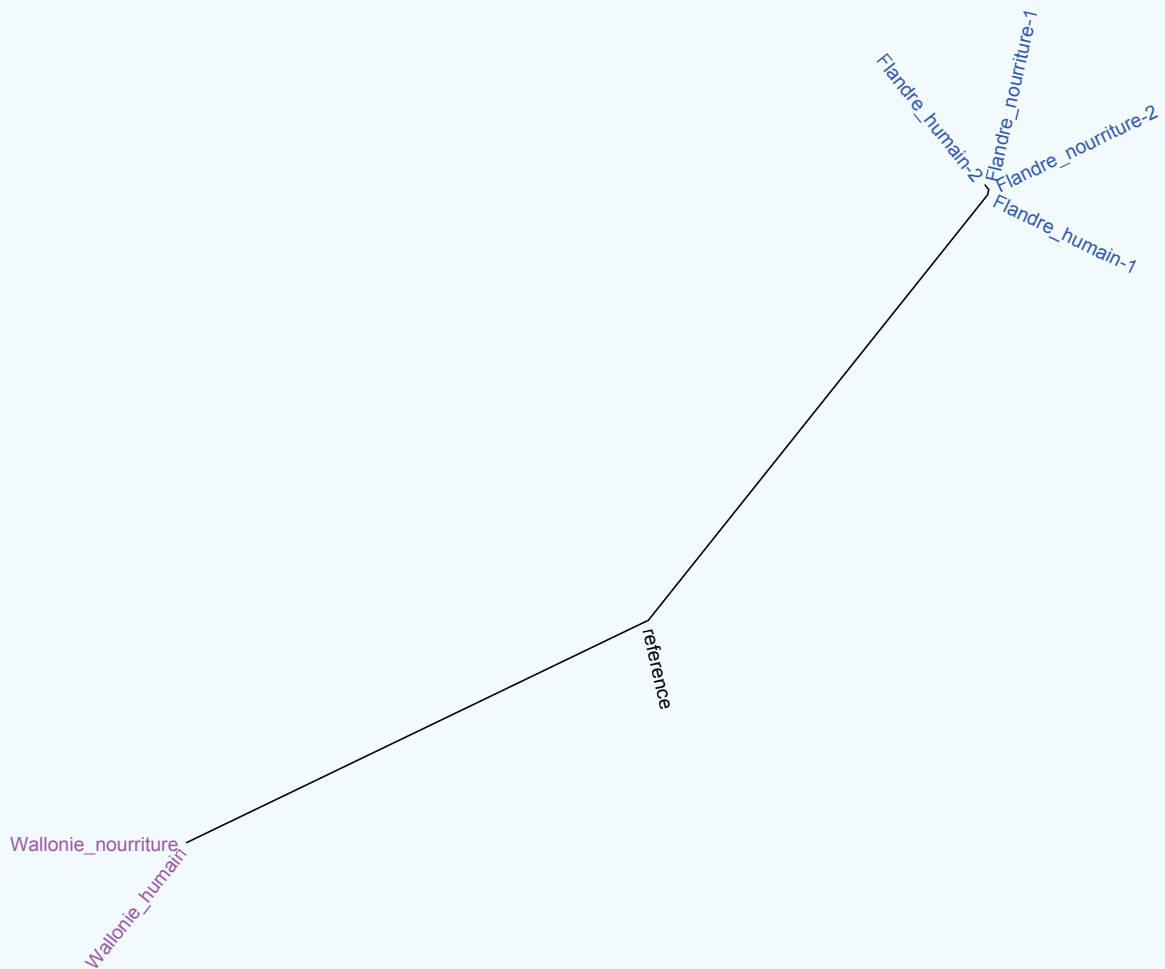


Figure 1. Arbre phylogénétique des isolats de l'épidémie généré avec FigTree [7]. La référence est *S. Enteritidis* P125109 (en noir). Les isolats de l'épidémie flamande sont représentés en bleu; ceux de l'épidémie wallonne en pourpre.

Ce cas d'étude montre qu'un "fingerprinting" plus détaillé des isolats d'épidémie est possible avec le WGS, puisque les isolats de *S. Enteritidis* de chaque épidémie ont pu être distingués sur base de l'analyse SNP, ce qui n'était pas possible avec un typage classique par phage et MLVA. Il montre aussi que les analyses WGS basées sur le contenu génétique peuvent encore mieux peaufiner la caractérisation des isolats d'épidémies. Bien que la technologie NGS puisse encore dans certains cas rester couteuse, avec la nouvelle diminution des prix NGS, les essais de typage séparés, chacun s'ajoutant significativement au coût total de l'investigation de l'épidémie, pourraient dans le futur être remplacés par ce test unique et universellement applicable. De plus cela souligne, que l'analyse WGS n'est pas strictement réservée aux bio-informaticiens. Ainsi, cette étude démontre clairement le potentiel de l'utilisation du WGS dans le LNR-TIA pour l'investigation des épidémies futures. Ces investigations d'épidémies bénéficieront d'avantage encore plus d'une future analyse WGS de routine de chaque isolat envoyé au LNR-TIA ou CNR spécifique pour mieux discriminer les souches d'épidémies des isolats circulant en bruit de fond.

Les résultats détaillés de cette étude ont été soumis pour publication peer-review.



## Remerciements

Les auteurs souhaitent remercier l'Agence Fédérale pour la Sécurité de la Chaîne alimentaire (AFSCA) et les Communautés française et flamande pour la collaboration excellente. Cette étude a été financée par une bourse P4044.0103 (SalMoType) de l'Institut Scientifique de Santé Publique (WIV-ISP - RP/PJ). Le LNR-TIA est co-financé par l'Agence Fédérale pour la Sécurité de la Chaîne alimentaire et le service Public Fédéral de la Santé, de la Sécurité de la Chaîne Alimentaire et de L'Environnement. Le CNRSS est partiellement financé par le Ministère Belge des Affaires sociales grâce à un fond au sein du système d'assurance Santé.

## Références

1. Mellmann A, Harmsen D, Cummings CA, Zentz EB, Leopold SR, Rico A, Prior K, Szczepanowski R, Ji Y, Zhang W, McLaughlin SF, Henkhaus JK, Leopold B, Bielaszewska M, Prager R, Brzoska PM, Moore RL, Guenther S, Rothberg JM, Karch H (2011) Prospective genomic characterization of the German enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 outbreak by rapid next generation sequencing technology. *PLoS ONE* 6: e22751.
2. Kaas RS, Leekitcharoenphon P, Aarestrup FM, Lund O (2014) Solving the problem of comparing whole bacterial genomes across different sequencing platforms. *PLoS ONE* 9: e104984.
3. Larsen MV, Cosentino S, Rasmussen S, Friis C, Hasman H, Marvig RL, Jelsbak L, Sicheritz-Pontén T, Ussery DW, Aarestrup FM, Lund O (2012) Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *J Clin Microbiol* 50: 1355-1361.
4. Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, Aarestrup FM, Larsen MV (2012) Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother* 67: 2640-2644.
5. Carattoli A, Zankari E, García-Fernández A, Larsen MV, Lund O, Villa L, Aarestrup FM, Hasman H (2014) *In silico* detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob Agents Chemother* 58: 3895-3903.
6. Alikhan N-F, Petty NK, Ben Zakour NL, Beatson SA (2011) BLAST Ring Image Generator (BRIG): simple prokaryote genome comparisons. *BMC Genomics* 12: 402.
7. Rambaut, Andrew (2014) FigTree. Available: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>. Accessed: 15-4-2015.

sigrid.dekeersmaecker@wiv-isp.be; sarah.denayer@wiv-isp.be et katelijne.dierick@wiv-isp.be

# Denrées alimentaires halal : méthodes d'analyse pour la détection de traces de viande de porc dans les viandes et produits à base de viande

Rob Margry

Président AOAC Section Lowlands

L'intégrité, l'authenticité et la "loyauté commerciale" sont des points d'attention de plus en plus importants dans le domaine de la production et de la commercialisation de denrées alimentaires. L'affaire de la viande de cheval en constitue un bon exemple. La question qui se pose ici est de savoir si la composition du produit correspond bien au texte mentionné sur l'étiquette. Cette question n'est pas soulevée dans un souci de sécurité alimentaire mais bien pour répondre aux souhaits du consommateur, généralement basés sur des fondements traditionnels, religieux ou émotionnels. Ainsi, la demande de viandes fraîches halal et de produits à base de viande halal, dépourvus de la moindre trace de viande de porc, va croissante depuis plusieurs années. Quelque 16 millions de musulmans vivent en Europe, 72 millions en Turquie et 1,5 milliard de par le monde.

Le consommateur demande de la transparence. Tout comme pour les produits issus du commerce équitable et les produits de l'agriculture biologique, on retrouve ici la nécessité d'un label. Mais les labels halal existants ne sont pas uniformes.

Dans la pratique du halal, les demandes d'analyse portent jusqu'à présent exclusivement sur la détection de matières porcines bien que, dans le Coran, d'autres espèces animales et produits animaux soient considérés comme «haram» (non autorisés à la consommation).

Dans la pratique, une tolérance zéro est appliquée quant à la présence de viande de porc. Cependant, les résultats d'analyse obtenus par le biais de différentes méthodes d'analyse, chacune avec ses propres caractéristiques de performance, s'avèrent bien souvent contradictoires. Ces méthodes sont basées sur des principes différents (par exemple détection de l'ADN ou de protéines). Elles présentent de ce fait des écarts au niveau de la limite de détection et du pourcentage de résultats faux négatifs et faux positifs. Par exemple, en cas de présence de viande porcine en très faible concentration, la répétition de l'analyse au sein du même laboratoire est elle aussi susceptible de donner des résultats contradictoires. Les producteurs qui souhaitent faire contrôler leurs produits ont souvent l'impression, à tort, que les laboratoires accrédités selon la norme ISO 17025 obtiendront tous le même résultat d'analyse.



On constate donc ici clairement le besoin d'une méthode de référence au regard de laquelle les autres méthodes pourraient être évaluées. Voilà un an et demi, un groupe de travail (CEN/TC 425) a été mis sur pied au sein du Comité européen de Normalisation (CEN), dont la mission est de formuler une norme applicable aux systèmes de gestion dans la production de denrées alimentaires halal. Le processus de production est ici basé sur les principes HACCP. Outre la traçabilité, une évaluation de la conformité sera également reprise, incluant la vérification à l'aide d'analyses.

Le contrôle porte non seulement sur le produit fini mais doit aussi s'attarder sur la contamination de la chaîne de production, par exemple au moyen d'écouvillons.

En 2006, un laboratoire européen de référence a été créé pour développer des méthodes permettant la détection de matières animales dans les aliments pour animaux ainsi que l'identification de l'espèce animale dont elles sont issues : le laboratoire EURL-AP (CRA-W, Gembloux). La consommation de viandes d'animaux domestiques agricoles qui ont été déclarées propres à la consommation humaine n'étant pas considérée comme un risque sanitaire, il n'existe pas de laboratoire officiel de référence au niveau européen pour la spécification des espèces animales dans les denrées alimentaires. Par ailleurs, en 2013, la DG Santé a chargé le laboratoire EURL-AP d'émettre une recommandation pour la détection de viande de cheval dans les viandes et produits à base de viande.

## Méthodes d'analyse couramment utilisées

K. Nakyinsige *et al* (2012) fournissent un relevé des méthodes d'analyse jugées appropriées pour la détection de tissus porcins dans les (produits à base de) viandes. La PCR (détection de l'ADN) et les méthodes immuno-chimiques et chromatographiques (détection des protéines) sont citées, mais également la LC-MS/MS, les méthodes à biocapteur, la FTIR (analyse des graisses) et la calorimétrie différentielle à balayage (DSC). Dans la pratique, ce sont surtout la PCR et l'immunochimie qui sont appliquées en routine. Les autres techniques étant en cours de développement, il ne faut pas s'attendre à ce qu'elles soient validées avant quelques années pour une application dans le monitoring des produits halal.

En attendant, un grand nombre de méthodes d'analyse sont disponibles sur le marché pour l'identification des espèces animales. Selon les fournisseurs, certains kits ne peuvent être utilisés que sur la viande fraîche. D'autres pourraient également être employés pour l'analyse de produits préparés (chauffés) à base de viande. Dans le cadre de la tolérance zéro, il est frappant de constater que les différents fournisseurs appliquent des limites de détection différentes à leurs produits. Celles-ci s'avèrent varier entre 5 % et 0,0001 %. La question qui se pose ici est de savoir quel type de matériel de référence est utilisé pour fixer cette limite. Par exemple, si l'on dope de la viande de bœuf fraîche avec de la viande de porc, une courbe d'étalonnage peut être établie, permettant de donner un résultat (semi-)quantitatif sur base du poids. Cependant, une fois la viande transformée (et plus particulièrement chauffée), on ne sait pas dans quelle mesure l'ADN ou les protéines sont restés intacts. Ces molécules peuvent avoir été dénaturées au point qu'une proportion indéterminée ne sera plus détectée. Une fois la viande transformée, les méthodes appliquées ne peuvent donc être utilisées que de manière qualitative : on peut seulement rapporter l'aspect "détectable" ou "non détectable". Dans ce cas, on peut choisir de baser le résultat sur la viande fraîche, mais on se retrouve alors avec une sous-estimation de la teneur réelle.

## Méthodes PCR

À l'heure actuelle, dans le cadre du contrôle halal, ce sont les méthodes PCR en temps réel qui sont privilégiées pour l'analyse en routine de viandes fraîches ou de produits préparés à base de viande. On utilise également parfois la PCR avec polymorphisme de longueur des fragments de restriction, avec séparation par électrophorèse des fragments d'ADN multipliés. Cette approche est toutefois complexe et davantage sensible aux résultats faux positifs. Les différentes méthodes de PCR en temps réel utilisent généralement différentes cibles (fragments d'ADN), avec l'utilisation d'un set d'amorces et d'une sonde appropriés à cette cible. Il en résulte différentes caractéristiques de performance, notamment le pourcentage de résultats faux positifs et de faux négatifs, mais aussi différentes limites de détection. Le mode de préparation de l'échantillon (broyage, homogénéisation et extraction) revêt bien sûr également son importance. La limite de détection d'une méthode PCR en temps réel ne dépend pas seulement du type d'appareil utilisé, mais aussi de chaque appareil individuel. Le laboratoire EURL-AP (voir Planchon *et al*, 2010) a développé un protocole permettant de définir pour chaque appareil, à l'aide de plasmides étalons, une limite de décision entre le «détecté» et le «non détecté». Cela permet de réduire considérablement les écarts entre résultats.

Dans leur relevé des méthodes, K. Nakyinsige *et al* (2012) citent notamment la PCR en temps réel développée par Fumière *et al* (2006). L'avantage de cette méthode est qu'elle utilise un amplicon court (68 paires de base). Les amplicons de moins de 100 paires de base sont moins sensibles à une dénaturation (thermique) de l'ADN. Une nouvelle variante améliorée de cette méthode a récemment été développée et est actuellement testée via une étude de validation interlaboratoire. Cette méthode conviendrait également à l'analyse de la viande. NutriControl a mené des expériences orientatives sur la viande, qui en apportent la confirmation.

## Méthodes immunochimiques

Autant les essais immuno-enzymatiques (ELISA) que les essais à flux latéral (bandelettes réactives) sont utilisés. Ces méthodes sont, en général, moins sensibles que les méthodes de PCR en temps réel et détectent les protéines de porc. Une protéine cible souvent utilisée est la Troponine I, une protéine thermostable des muscles squelettiques. Un inconvénient de la détection protéique est que la protéine cible n'est pas présente dans tous les tissus. L'ADN, par contre, est présent dans chaque cellule contenant un noyau.

NutriControl compare actuellement l'utilisation pratique d'un certain nombre de méthodes ELISA.

## Standardisation des méthodes d'analyse

Puisqu'il ne faut pas s'attendre à ce qu'une limite de tolérance consensuelle soit définie pour les composants porcins présents dans la viande, le besoin existe d'une méthode d'analyse normalisée (standard) au regard de laquelle les laboratoires pourraient évaluer leur propre méthode. Par ailleurs, il est également important que les laboratoires prennent part à des essais inter-laboratoires.

Il est possible que plusieurs méthodes soient appropriées mais, en tout cas, la nouvelle méthode mise au point par le laboratoire EURL-AP pourrait s'avérer une bonne candidate.

## Littérature

- Nakyinsige K., Che Man Y.B. and Sazili A.Q. (2012): Halal authenticity issues in meat and meat products; Meat Science 91, 207 – 214.
- Fumière O., Dubois M., Baeten V., von Holst C. and Berben G.(2006): Effective PCR detection of animal species in highly processed animal byproducts and compound feeds; Anal. Bioanal. Chem. 385, 1045 – 1054.
- Planchon V., Oger R., Marien A., Berben G. and Fumière O.; AGROSTAT, February 23 -26 2010, Benevento, Italy.

Rob.margry@nutricontrol.nl

# Analyse d'allergènes alimentaires par LC-MS/MS

*Gillard Nathalie, Otto Gaëtan et Delahaut Philippe*

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

## Introduction

Les allergies alimentaires constituent un problème croissant auquel les consommateurs allergiques, les producteurs agro-alimentaires et les agences de réglementation ont à faire face. On diagnostique de plus en plus de consommateurs allergiques (de 2 à 3% chez les adultes et jusqu'à 8% chez les enfants) et seule l'élimination complète de l'allergène dans le régime alimentaire permet d'éviter la réaction allergique.

La présence non identifiée et non déclarée d'allergènes dans les produits alimentaires peut parfois conduire à des réactions de type anaphylactique. Le règlement européen 1169/2011 rend obligatoire l'étiquetage de 14 ingrédients allergènes (les céréales contenant du gluten, les crustacés, l'œuf, les poissons, l'arachide, le soja, le lait, les fruits à coque, le céleri, la moutarde, le sésame, les sulfites, les mollusques, le lupin et tous les produits dérivés de ces aliments) pour les produits préemballés.

Pour la plupart des industries agro-alimentaires, et surtout pour les petites, il est économiquement impossible de dédier exclusivement des lignes de production à un seul type de produit et des contaminations croisées sont donc possibles. Cette présence fortuite d'allergènes n'est pas couverte par la législation et de nombreuses entreprises privilégient actuellement l'étiquetage de précaution par rapport à la mise en place d'un programme de gestion du risque de contamination croisée dans leur chaîne de production.

Afin d'évaluer la présence éventuelle d'allergènes dans leurs produits et d'apposer l'étiquetage en conséquence, les industries agroalimentaires ont besoin d'outils analytiques fiables et spécifiques.

Actuellement, la détection des allergènes dans les denrées alimentaires est principalement réalisée par des méthodes ELISA et PCR (ou RealTime PCR). Ces deux types de méthodes présentent cependant des limitations. En effet, l'analyse par PCR ne permet de détecter que la présence de l'ADN spécifique d'ingrédients allergisants. Les méthodes immunologiques présentent quant à elles une grande variabilité lors de la quantification, due à la présence d'interférences de la matrice et aux spécificités des différents anticorps constituant les kits ELISA commerciaux ; les résultats de ces analyses sont fortement influencés par la transformation des denrées alimentaires et des faux résultats négatifs sont ainsi générés.

La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS) s'avère être une technique de choix pour identifier, confirmer et doser en routine les allergènes. En effet, cette technique est très spécifique (elle permet d'identifier et de confirmer la présence d'un composé sur base de son temps de rétention et de son profil de fragmentation en spectrométrie de masse), robuste et sensible. Elle présente également l'avantage de pouvoir doser plusieurs allergènes au cours d'une seule analyse, au contraire des tests ELISA, ce qui réduit les coûts d'analyse et est donc économiquement intéressant. De plus, sa spécificité et sa robustesse permettent de réduire les interférences dues à la matrice.

## Principe de l'analyse des allergènes par spectrométrie de masse

Le principe de base de l'analyse des allergènes par spectrométrie de masse est décrit à la figure 1.

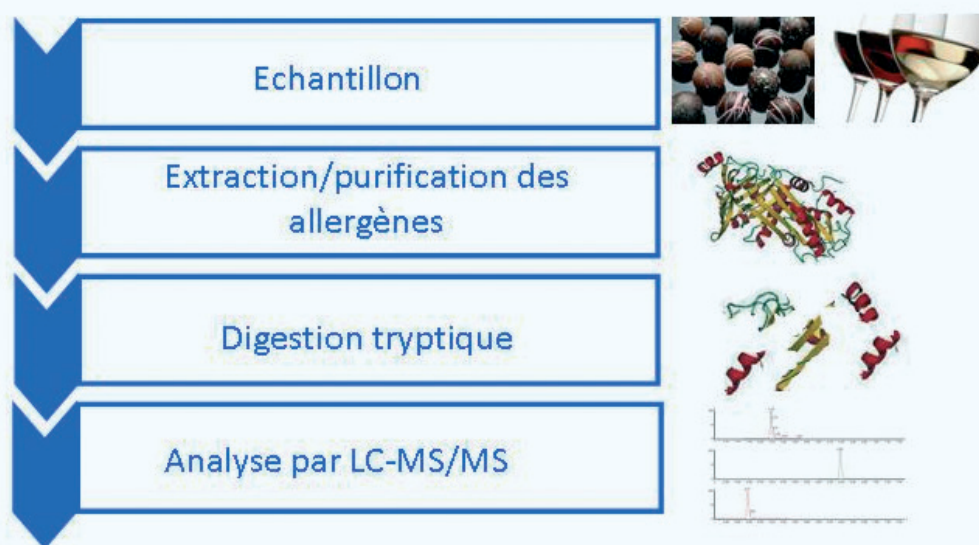


Figure 1. Principe de l'analyse des allergènes alimentaires par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem

L'approche utilisée pour analyser les allergènes présente certaines particularités, comparée à celle appliquée pour l'analyse de résidus et contaminants de type non protéique (résidus médicamenteux, toxines, ..). Ces particularités sont liées à la taille des allergènes et aussi à leur structure. Ces stratégies sont détaillées ci-dessous.

### 1. Etape pré-instrumentale : digestion des allergènes

Après extraction/purification, l'extrait est soumis à une digestion enzymatique avant son analyse en MS/MS. En effet, les allergènes sont des protéines dont la masse moléculaire va de quelques dizaines de kDa (lysozyme, caséine) à plus de 150 kDa (ovomucine). Si l'analyse de ces protéines entières est possible à l'aide de spectromètres de masse de type « Time of Flight » (ToF), ces protéines ont une taille trop grande que pour être analysées par des spectromètres de type triple quadrupole dont la gamme de masse dépasse rarement 2000 Da. La digestion enzymatique permet de générer des peptides dont la taille sera compatible avec leur analyse en LC-MS/MS. Parmi les enzymes commercialement disponibles, la trypsine représente une enzyme de choix car elle est très spécifique – elle clive après les acides aminés lysine et arginine-, génère des peptides comprenant entre 7 et 20 acides aminés – qui sont donc compatibles avec l'analyse en LC-MS/MS- et est relativement bon marché comparée aux autres endoprotéases. Pour certaines protéines, telles que les gliadines, la trypsine ne sera pas une enzyme de choix car leur séquence primaire compte trop peu de lysines et d'arginine (voir Figure 2) ; dans ce cas, une autre enzyme, une combinaison d'enzymes (trypsine/chemotrypsine) ou encore une digestion chimique seront préférés pour la digestion.



sp|P18573|GDA9\_WHEAT Alpha/beta-gliadin, *Triticum aestivum*  
 MKTFLILALLAIVATTAR**RI**AV**R**VPVPQLQPQNPSQQQPQEQVPLVQQQQFPGQQQPFPPQQPYQPQPFPSQQPYLQL  
 QPFPQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQFRPQQYPQSQPQYSQPQQPISQQQQQQQQQQKQQQQQQQQIL  
 QQILQQQLIPCRDVVLQQHSIAYGSSQVLQQSTYQLVQQLCCQQLWQIQEQSRCQAIHNVVHAILHQQQQQQQQQ  
 QQPLSQVSFQQPQQQYPSGQGSFQPSQQNPQAQGSVQPQQLPQFEEIRNLALETLPAMCNVYIPPYCTIAPVGIFGTN

Figure 2. Séquence de la gliadine de blé. Les sites de clivage de la trypsine sont représentés en rouge

## 2. Développement d’une méthode instrumentale de dosage des allergènes par LC-MS/MS

Après digestion, les échantillons sont ensuite analysés par LC-MS/MS. Un défi majeur de l’analyse des allergènes alimentaires par spectrométrie de masse est d’identifier des protéines et/ou des peptides qui soient spécifiques de l’allergène cible, robustes à la transformation des denrées alimentaires et qui permettent d’atteindre une bonne sensibilité.

Pour un ingrédient allergène, plusieurs protéines peuvent être sélectionnées. Les critères de sélection sont la disponibilité de sa séquence dans les bases de données, l’abondance de la protéine dans l’allergène et sa digestibilité par l’enzyme choisie. Le Tableau 1 illustre les protéines spécifiques à l’arachide. Dans le cas des arachides, les protéines *Ara h1* et *Ara h2* représentent respectivement 20% et 10% des protéines totales et semblent donc de bonnes protéines cibles pour l’analyse en MS.

Il est également important de souligner qu’une protéine cible en spectrométrie de masse ne doit pas nécessairement être allergisante, le but étant ici de prouver la présence d’un ingrédient allergène et non de prouver l’allergénicité de la denrée alimentaire testée.

Tableau 1. Protéines présentes dans l’arachide

Protéine	Famille	Masse moléculaire (kDa)
Ara h1	vicillines	64,5
Ara h2	conglutines	17,5
Ara h3	glycinines	14
Ara h4	glycinines	35,9
Ara h5	profilines	14
Ara h6	conglutines	14,5
Ara h7	conglutines	15,8

Pour chaque protéine sélectionnée, de nombreux peptides seront générés après digestion enzymatique. La figure 3 montre l’exemple des protéines *Ara h1*, *Ara h2* et *Ara h3-4* de l’arachide; la trypsine clive après les résidus arginine et lysine, ce qui permet d’identifier les nombreux peptides qui seront générés après digestion tryptique.



**sp|P43238|ALL12\_ARAHY** Allergen Ara h 1, clone P41B OS=Arachis hypogaea PE=1 SV=1  
 MRGRVSPMLLLLGLVLSASVATHAKSSPYQKKTENPCAQRCLQSCQQEPDDLKQKACESRCKLEYDP  
 RCVYDPRGHTGTTNQRSPPGERTRGRQPGDYDDDRRQPRREEGGRWGPAGPREEREREEDWRQPRE  
 DWRRPSHQQRKIRPEGREGEQEWGTPGSHVREETSRRNPFYFPSRRFSTRYGNQNGRIRVLQRFDQ  
 RSRQFQNLQNHRIVQIEAKPNTLVLPKHADADNILVIQQGQATVTVANGNNRKSFNLDEGHALRIPSGFISY  
 ILNRHDNQNLRVAKISMPVNTPGQFEDFFPASSRDQSSYLQGFSTRNTLEAAFNAEFNEIRRVLLEENAGG  
 EQEERGGRRWSTRSSENNEGVIVKVSKEHVEELTKHAKSVSKKGSEEEGDITNPINLREGEPDLSNNFGK  
 LFEVKPKDKKNPQLQDLDMMLTCVEIKEGALMLPHFNSKAMVIVVVKGTGNLELVAVRKEQQQRGRREE  
 EEDEDEEEEGSNREVRRYTARLKEGDVFIMPAHPVAINASSELHLLGFGINAENNRIFLAGDKDNVIDQI  
 EKQAKDLAFPGSGEQVEKLIKQKESHFVSARPPQSQSQSPSSPEKESPEKEDQEEENQGGKGPLLSILKAFN

**tr|Q8LKN1|Q8LKN1\_ARAHY** Allergen Arah3/Arah4 OS=Arachis hypogaea PE=3 SV=1  
 MGKLLALSVCFCFLVLGASSISFRQQPEENACQFQRLNAQRPDNRIESEGGYIETWNPNNQEFECAGVAL  
 SRLVLRNALRRPFYSNAPQEIFIQQGRGYFGLIFPGCPSTYEPAQQGRRHQSQRPPRRFQQGDQSQQ  
 QQDSHQKVHRFDEGDLIAVPTGVAFWYNDHDTDVAVSLTDTNNNDNQLDQFPRRFNLAGNHEQEFL  
 RYQQQSRRRSLPYSYSPQTPKQEDREFSPRGQHGRRRERAGQEENEGGNIFSGFTPEFLAQAFQVD  
 DRQILQNLRGENESDEQGAIVTVRGGLRILSPDRKRRQQYERPDEEEYDEDEYEEERQQDRRRGR  
 GSRGSGNGIETICTASFKNIGRNRSPDIYNPQAGSLKTANELQLNLLILRWLGLSAEYGNLYRNALFVPH  
 YNTNAHSIYALRGRAHVQVVDNSGDRVFDEELQEGHVLVVPQNFVAVAGKSQSENFEYVAFKTDSPSIA  
 NLAGENSFIDNLPEEVVANSYGLPREQARQLKNNNPFKFFVPPSEQSLRAVA

**sp|Q6PSU2|CONG7\_ARAHY** Conglutin-7 OS=Arachis hypogaea PE=1 SV=2  
 MAKLTILVALALFLLAAHASARQQWELQGDRRCQSQLEANLRPCEQHLMQKIQRDEDSYGRDPYSPSQ  
 DPYSPSQDPDRRDPYSPSPYDRRGAGSSQHQRCCNELNEFENNQRCCMCEALQQIMENQSDRLQGRQ  
 QEQQFKRELRLNPQQCGLRAPQRCDLEVESGGDRY

Figure 3. Séquences en acides aminés des protéines Ara h1, Ara h2 et Ara h 3-4 de la cacouhète. Les sites de clivage de la trypsin sont représentés en rouge (lysine K et arginine R). Les peptides sélectionnés pour la méthode LC-MS/MS sont soulignés en bleu.

A nouveau, une sélection doit être opérée, basée sur la longueur des peptides (l'analyse chromatographique sera optimale pour des peptides ayant entre 7 et 20 acides aminés ; la spécificité d'un peptide pourra quant à elle être vérifiée pour des peptides d'au-moins 8 acides aminés), leur spécificité pour l'allergène cible (la spécificité est vérifiée en faisant une recherche de la séquence du peptide dans les bases de données de type UNIPROT et en vérifiant que cette séquence peptidique ne peut pas être détectée dans d'autres protéines) et leur robustesse à la transformation des denrées alimentaires. En ce qui concerne la robustesse à la transformation des denrées alimentaires, certaines protéines voient leur conformation et/ou certains de leurs acides aminés modifiés (glycosylation, réaction de Maillard,...); ceci n'est pas un problème si les peptides ciblés en MS/MS sont eux toujours intacts après transformation et que le protocole d'extraction/purification permet toujours de les récupérer.



Les 2 premiers critères de sélection des peptides peuvent facilement être appliqués lors du développement de la méthode LC-MS/MS. Lorsqu'aucune information n'est disponible quant à la robustesse des peptides à la transformation des denrées alimentaires, il est conseillé d'introduire un maximum de peptides dans la méthode développée et de faire une sélection ultérieure.

La figure 4 montre le chromatogramme obtenu en analysant un échantillon d'arachide. Les peptides retenus dans cette méthode sont ceux respectant les critères de longueur et spécificité et présentant une bonne sensibilité lors de l'analyse d'un échantillon d'arachide.

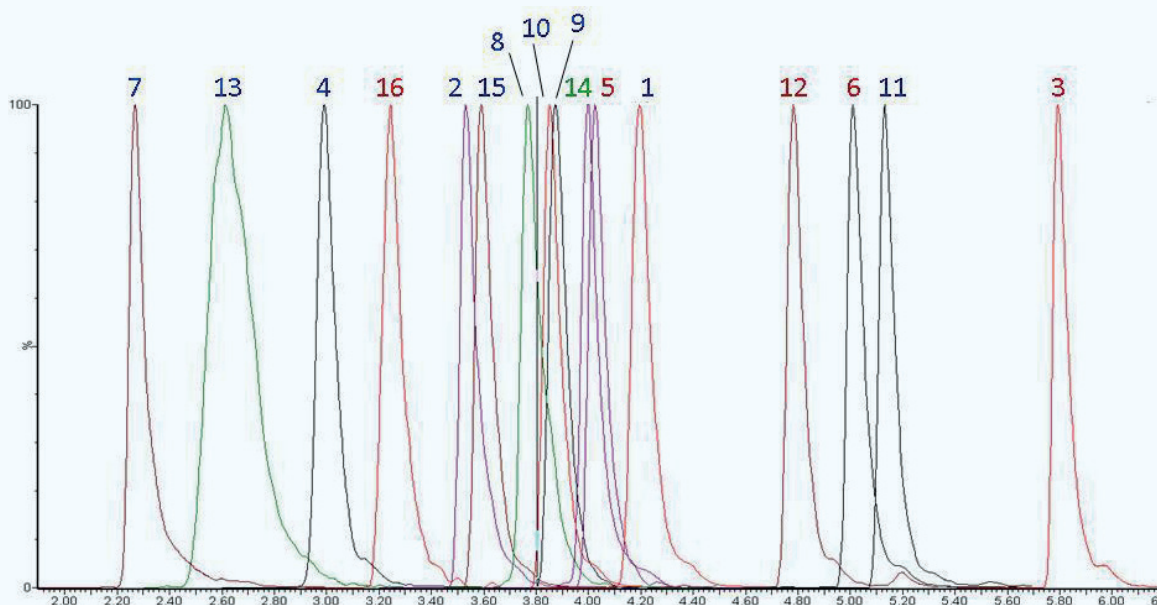


Figure 4. Chromatogramme représentant les peptides recherchés pour l'allergène « arachide ». Des peptides provenant des protéines Arah1 (bleu), Arah2 (vert) et Arah3-4 (rouge) sont représentés avec le code suivant : (1) NNPFYFPSR, (2) DQSSYLQGFSR, (3) SPDIYNPQAGSLK, (4) IPSGFISYLNR, (5) SQSENFYVAFK, (6) WLGLSAEYGNLYR, (7) VLLEENAGGEQEER, (8) GSEEEGDITNPINLR, (9) IVQIEAKPNTLVLPK, (10) GTGNLELVAVR, (11) NTLEAAFNAEFNEIR, (12) PFYSNAPQEIFIQQGR, (13) EGEPDLSNNFGK, (14) DPYSPSQDPYSPQDPDR, (15) DLAFPGSGEQVEK, (16) SLPYSPYSPQTQPK

L'analyse des peptides en routine se fera en mode MRM ; cette analyse présente cependant quelques particularités en comparaison à l'analyse de résidus médicamenteux.

En effet, les peptides parents seront bien souvent présents sous plusieurs états de charge (1+, 2+ et 3+), tout comme les ions filles. En ce qui concerne le type d'ions filles qui sont observés lors de l'analyse MS/MS de peptides, la nomenclature de Biemann présentée à la Figure 5 permet de comprendre la fragmentation des peptides et le type d'ions produits. Si pour chaque peptide, une multitude de fragments peptidiques peut théoriquement être détectée, il apparaît qu'en pratique, ce sont les ions a, b et y qui sont les plus fréquemment observés dans les collisions à basse énergie.

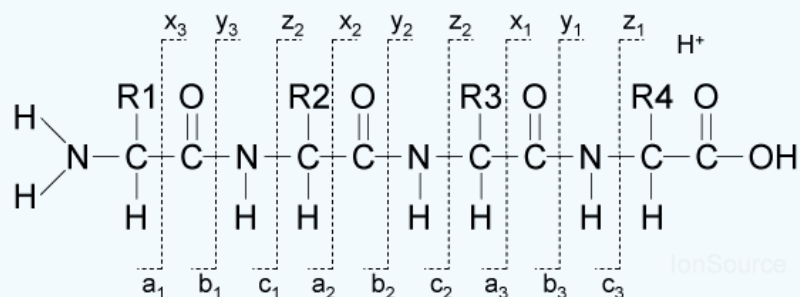


Figure 5. Fragmentation des peptides suivant la nomenclature de Biemann

Pour plus de spécificité de la méthode MS, des critères de sélection peuvent aussi être appliqués aux transitions MRM, comme par exemple cibler des transitions pour lesquelles le rapport  $m/z$  de l'ion parent est plus petit que celui de l'ion fille (ceci est possible en ciblant, par exemple, comme ion parent le peptide 2+ et comme ion fille un fragment 1+) et éviter les ions filles correspondant à des fragments de petite taille (un fragment de 2-3 acides aminés a plus de chance de pouvoir provenir d'un autre peptide qu'un fragment de 6-7 acides aminés).

Après avoir appliqué toutes les sélections décrites précédemment, il est enfin possible d'obtenir une méthode LC-MS/MS capable de détecter et identifier plusieurs allergènes. La Figure 6 montre le chromatogramme obtenu après analyse d'un échantillon de pain par une méthode LC-MS/MS permettant de détecter 7 allergènes (Heick *et al.*, 2011)

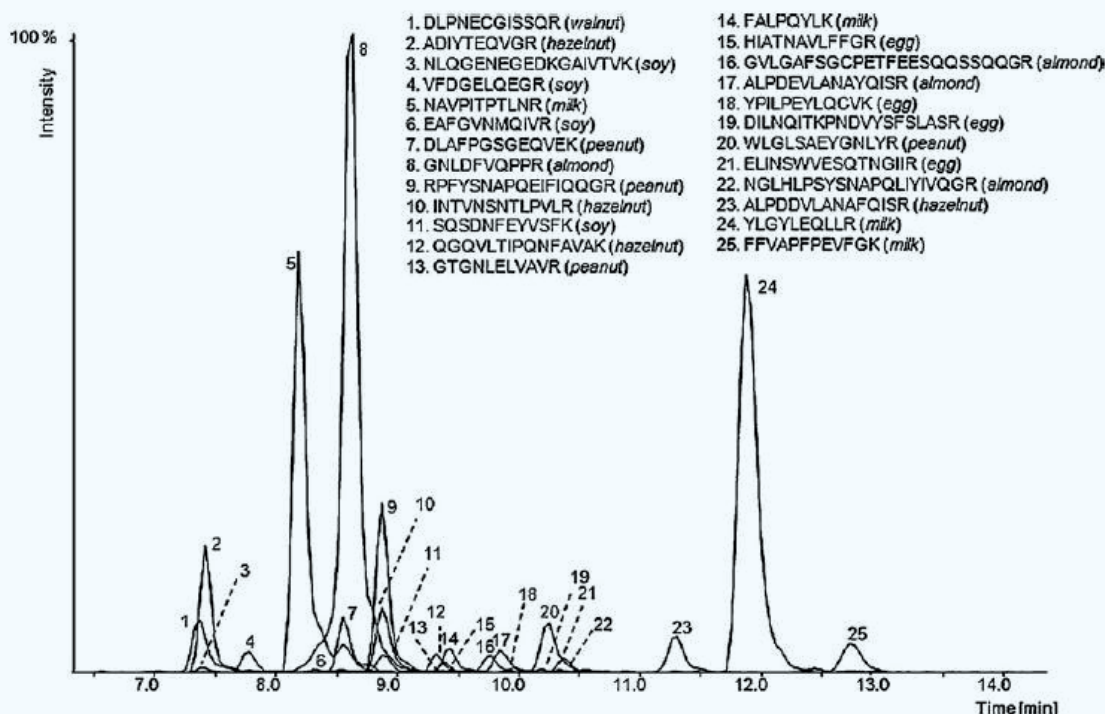


Figure 6. Transitions MRM suivies pour détecter 7 allergènes (noix, noisettes, soja, lait, arachides, amandes, œufs) présents à 1000 ppm dans un échantillon de pain (Heick *et al.*, 2011)



## Références

- Heick J., Fischer M., Popping B. (2011) First screening method for the simultaneous detection of seven allergens by liquid chromatography mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1218, p. 938–943
- Biemann K. (1988) Contributions of mass spectrometry to peptide and protein structure. *Biomed Environmental Mass Spectrometry*. (1-12), p.99-111

n.gillard@cergroupe.be

# Présence de retardateurs de flamme bromés (RFB), nouveaux ou émergents, dans les denrées alimentaires : état actuel de la législation européenne

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



## Les RFB déjà bien connus

Les retardateurs de flamme bromés (RFB) sont des produits chimiques d'origine anthropique utilisés dans le but d'augmenter le caractère ignifuge des matériaux. Ces composés organiques bromés ont commencé à être produits de manière industrielle au début des années 1970 et leur volume cumulé de production actuel dépasse les 400.000 tonnes/an [1]. Ils sont en grande partie utilisés dans l'industrie électronique, principalement dans les cartes de circuits imprimés des produits électroniques, dans les connecteurs et câbles ou composés tels que les protections en plastique (ex. : télévision, ordinateurs) mais ils sont aussi utilisés dans les tapis, le rembourrage, l'ameublement et la peinture.

leiden worden het vaakst gebruikt. Deze gebromeerde vlamvertragers kunnen uitloggen of verdampen uit de



Les RFB sont incorporés soit en tant qu'additif (mélangés à un polymère), comme c'est le cas des polybromodiphényléthers (PBDE), des polybromobiphényles (PBB) et des hexabromocyclododécane (HBCDD), soit en tant que réactif (liés de manière covalente à un polymère), comme c'est le cas du tétrabromobisphénol A (TBBPA). Les PBB, PBDE, HBCDD, TBBPA et leurs dérivés sont les plus couramment utilisés. Ces RFB peuvent migrer ou s'évaporer des produits dans lesquels ils sont incorporés. On a découvert qu'ils étaient omniprésents dans les zones reculées, que ce soit dans des échantillons abiotiques ou des échantillons de biote, ce qui prouve que ces substances sont persistantes dans l'environnement, incluant la propagation à longue distance dans l'environnement, la bioaccumulation dans les aliments aquatiques et terrestres et dans le biote humain. En 2009, les HexaBB, congénères BDE 47, 99, 153, 154, 175 et 183 ont été classés comme nouveaux polluants organiques persistants (POP) par la convention de Stockholm ; en 2013, les HBCDD ont aussi été ajoutés à la liste des nouveaux POP. Cela a donné lieu à l'interdiction de la production et de l'utilisation de certaines formulations de ces RFB.

Afin d'évaluer le besoin (ou non) de mesures réglementaires, la Commission européenne a demandé à l'Autorité européenne de Sécurité des Aliments (EFSA) de préparer un avis scientifique sur les risques pour la santé humaine qui sont liés à la présence de RFB dans les denrées alimentaires. Le groupe scientifique sur les contaminants dans les denrées alimentaires a adopté plusieurs avis scientifiques sur les différents types de RFB entre 2010 et 2012 [2,3,4,5,6]. L'EFSA a conclu que les RFB les plus importants (congénères BDE 28, 47, 100, 153, 154, 183, et 209 ; congénère BB 153 ; HBCDD  $\alpha,\beta,\gamma$  isomères ; TBBP-A) doivent faire l'objet d'un plan de surveillance basé sur la faisabilité analytique de mesurer, dans des laboratoires accrédités, leur taux d'occurrence dans l'alimentation humaine et animale. La Commission européenne a adopté une recommandation (2014/118/UE) stipulant que les États membres doivent réaliser le monitoring des RFB au cours des années 2014 et 2015 pour une large variété d'aliments reflétant les habitudes alimentaires [7]. Les méthodes d'analyse doivent atteindre une limite de quantification (LOQ) inférieure ou égale à 0,01 ng/g de poids frais pour les PBDE et les HBCDD, alors qu'une LOQ inférieure ou égale à 0,1 ng/g de poids frais est acceptée pour les TBBP-A et ses dérivés.

## RFB émergents et nouveaux RFB

Outre ces 'RFB déjà bien connus', une série de RFB moins connus et moins étudiés ont été classés comme « émergents » ou « nouveaux » [8]. Selon le rapport de l'EFSA sur ces nouvelles catégories de RFB ainsi que sur la base de la publication scientifique de Bergman et collaborateurs [9], les RFB émergents sont définis comme des produits chimiques utilisés en tant que retardateurs de flammes et qui ont été identifiés comme des produits chimiques d'origine anthropique présents dans tout milieu environnemental, dans les aliments, chez les animaux sauvages ou chez l'homme. Les nouveaux RFB sont définis comme des produits chimiques utilisés en tant que retardateurs de flammes, et dont la présence est confirmée dans des matériaux et/ou des marchandises en concentrations supérieures à 0,1% mais qui n'ont pas été identifiés dans des échantillons environnementaux, dans des denrées alimentaires, chez des animaux sauvages ou chez l'homme. Ces deux groupes de RFB englobent respectivement 17 et 10 composés individuels. La liste complète est disponible dans le rapport de l'EFSA [8]. Il est plutôt difficile d'estimer précisément la production de ces nouveaux RFB. Le rapport publié par Harju et collaborateurs estime le volume total de production à environ 180.000 tonnes/an [10]. Concernant les méthodes d'analyse, le rapport de l'EFSA mettait en avant le manque de méthodes d'analyse spécifiques pour nombre de ces RFB. Toutefois, parmi la liste, la recommandation 2014/118/UE de la Commission demandait d'effectuer des analyses du tris(2,3-dibromopropyl) phosphate (TDBPP), du N,N'-éthylènebis(tétrabromophthalimide) (EBTEBPI), de l'hexabromocyclodécane (HBCYD), du bis(2-éthylhexyl) tétrabromophthalate (BEH-TEBP), du 2-éthylhexyl 2,3,4,5-tétrabromobenzoate (EH-TBB) et du dibromonéopentylglycol (DBNPG) dans le poisson et les autres produits de la mer, la viande et les produits carnés, les graisses et huiles animales et végétales, le lait et les produits laitiers, les œufs et les ovoproduits ainsi que les aliments pour nourrissons et pour enfants en bas âge [7]. Une limite de quantification inférieure ou égale à 1 ng/g de poids frais est exigée pour ces RFB. Il convient de noter que les défis analytiques afin de développer des méthodes adéquates sont ici bien plus complexes que lorsque les méthodes ont été développées il

y a quelques années pour les RFB déjà bien connus, comme les PBDE. Une large variété d'approches analytiques sont nécessaires pour l'extraction et la purification des échantillons ainsi que pour l'analyse instrumentale [11]. De plus, un nombre limité d'étalons sont disponibles pour les nouveaux RFB et les RFB émergents, y compris quelques étalons marqués au  $^{13}\text{C}$  pour la quantification par dilution isotopique au moyen de techniques basées sur la LC-MS (chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse) ou sur la GC-MS (chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse), mais ils ne sont pas suffisants. Une large série d'étalons et de matériaux de référence doit être développée.

Des rapports, des avis et des publications scientifiques ont révélé et identifié un certain nombre de lacunes en matière de recherche concernant les aspects analytiques, les questions environnementales, les teneurs dans les aliments, les caractéristiques physico-chimiques, les risques toxicologiques et l'exposition humaine à ces nouveaux RFB et RFB émergents. Des études et des projets de recherche doivent être entrepris pour rassembler des données expérimentales supplémentaires. Dans ce contexte, une récente publication évoquait de possibles préoccupations concernant la présence de déchloranes (Déchloranes Plus, Déchloranes 602, Déchloranes 603, Déchloranes 604, et Chlordane Plus) dans des échantillons de sérum humain provenant d'Europe de l'Ouest [12]. Malgré le fait que ces RF chlorés et chloro-bromés mélangés n'ont jamais été produits en Europe, ils ont été mesurés à des niveaux plus élevés que la plupart des PBDE. Les déchloranes ont par ailleurs été détectés dans des denrées alimentaires belges à un niveau pg/g de graisse, correspondant à une dose journalière estimée à plus de 100 pg [13]. Comme nous savons très peu de choses sur la toxicité de ces composés, ces rapports ne démontrent pas encore le besoin d'un contrôle régulier des denrées alimentaires et des aliments pour animaux mais ils mettent au moins les déchloranes en évidence, comme faisant partie des prochaines cibles possibles.

### Références :

- (1) Eljarrat E, Barcelo, Brominated Flame Retardants, New York : Springer 2011
- (2) Scientific Opinion on Polybrominated Biphenyls (PBBs) in Food. *EFSA Journal* 2010; 8(10):1789. [151 pp.] doi:10.2903/j.efsa.2010.1789.
- (3) Scientific Opinion on Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) in Food. *EFSA Journal* 2011; 9(5):2156. [274 pp.] doi:10.2903/j.efsa.2011.2156.
- (4) Scientific Opinion on Hexabromocyclododecanes (HBCDDs) in Food. *EFSA Journal* 2011; 9(7):2296. [118 pp.] doi:10.2903/j.efsa.2011.2296.
- (5) Scientific Opinion on Tetrabromobisphenol A (TBBPA) and its derivatives in food. *EFSA Journal* 2011; 9(12):2477. [61 pp.] doi:10.2903/j.efsa.2011.2477.
- (6) Scientific Opinion on Brominated Flame Retardants (BFRs) in Food: Brominated Phenols and their Derivatives. *EFSA Journal* 2012; 10(4):2634. [42 pp.] doi:10.2903/j.efsa.2012.2634.
- (7) Commission Recommendation 2014/118/EU of 3 March 2014, Official Journal of the European Union
- (8) Scientific Opinion on Emerging and Novel Brominated Flame Retardants (BFRs) in Food. *EFSA Journal* 2012; 10(10):2908. [125pp.] doi:10.2903/j.efsa.2012.2908.
- (9) Bergman A, Ryden A, Law R. J, de Boer J, Covaci A, Alaee M, Birnbaum L, Petreas M., Rose M., Sakai S., Van den Eede N., van der Veen I., *Environment International* 49 (2012) 57-82
- (10) Harju M, Heimstad ES, Herzke D, Sandanger T, Posner S, Wania F. Report 2462. Oslo, Norway: Norwegian Pollution Control Authority; 2009. 113.
- (11) Covaci A., Harrad S., Abdallah M.A., Ali N., Law R.J., Herzke D., de Wit C. A., *Environment International*, 37 (2011), 532-556.
- (12) Brasseur C., Pirard C., Scholl G., De Pauw E., Viel J-F., Shen L., Reiner E.J., Focant J-F., *Environment International*, 65 (2014), 33-40.
- (13) L'Homme B., Calaprice C., Calvano C., Zamboni C., Leardi R., Focant J-F., *Chemosphere*, 139 (2015), 525-533.

G.Eppe@ulg.ac.be



# Caractérisation des UGM en utilisant une stratégie de marche chromosomique

Fraiture Marie-Alice<sup>1,2,3</sup>, Herman Philippe<sup>1</sup>, Papazova Nina<sup>1</sup> et Roosens Nancy<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institut Scientifique de Santé Publique (WIV-ISP), Plateforme de Biotechnologie et Biologie Moléculaire (PBB) et service de Biosécurité et Biotechnologie (SBB), 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

<sup>3</sup> University of Gent, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, Ottergemsesteenweg 460, 9000 Ghent, Belgium

Pour augmenter la productivité en agriculture, des stratégies de biotechnologie permettant de produire des plantes génétiquement modifiées (GM) ont été développées. Comme le riz est un des aliments principal de base, dans le contexte du projet UGMONITOR (convention RF 11/6242), plus de 1000 publications « peer-reviewed » ont été collectées, couvrant la période de 1991 à 2015, pour fournir une vue d'ensemble des lignées de riz transgéniques décrites au stade R&D (IRRI; Scopus). La majorité de ces études ont été réalisées en Asie (77.8%), plus particulièrement en Chine (47.4%) et au Japon (20.9%). Même si ces riz ont été principalement testés uniquement en laboratoire (70.6%), 23.8% d'entre eux ont été sujets à des essais en champs. Concernant l'information génétique, une grande variété de traits et de gènes correspondants ont été observés (e.g. résistance aux insectes, tolérance aux herbicides, résistance aux stress biotiques, résistance aux stress abiotiques, amélioration du rendement en grain, composition nutritionnelle plus saine). Parmi les vecteurs de transformation, la famille des vecteurs pCAMBIA a été identifiée comme fréquemment utilisée (544 des riz GM (34.6%) dans 359 publications « peer-reviewed ») (Cambia, Canberra, Australie). Par ailleurs, 30% des plantes transgéniques ont été reportées comme étant transformées avec ce vecteur (Komori *et al.*, 2007). De plus, plus de 70% des riz GM collectés possèdent les éléments p35S et/ou tNOS dans leur cassette transgénique.

Sur base de cette vue d'ensemble et de l'information disponible dans plusieurs banques de données (Biosafety Cleaning-House; CERA's database; GMDD; GMO Compass), les éléments clés p35S et tNOS, présents à la fois dans les organisme génétiquement modifiés (OGM) autorisés et les OGM non-autorisés (UGM) en UE, ainsi que l'élément t35S de la famille de vecteurs pCAMBIA, absent de tous les OGM autorisés en UE mais trouvé dans approximativement 30% des plantes GM non-autorisées en UE, ont été sélectionnés. Ces éléments ont été ciblés pour développer une stratégie innovatrice et intégrée, basée sur la marche chromosomique, dans le but de prouver la présence d'un large spectre d'OGM dans la chaîne alimentaire humaine et animale.

Dans cette stratégie, la présence d'OGM est d'abord évaluée par un criblage qPCR ciblant les éléments clés (p35S, tNOS et t35S pCAMBIA). En cas de signal positif, la présence suspectée d'OGM peut être confirmée par les fragments d'ADN comprenant la jonction entre la cassette transgénique et le génome de la plante et/ou les associations non-naturelles des éléments obtenus via les méthodes de marche chromosomique correspondantes utilisant les mêmes amorces que celles employées dans l'étape de criblage (Fraiture *et al.*, 2014, 2015a et 2015b) (Figure 1).



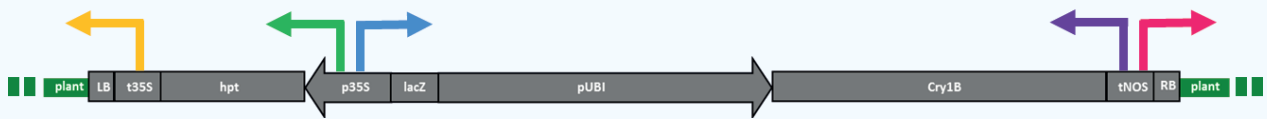


Figure 1: Stratégie de marche chromosomique utilisée sur du riz Bt génétiquement modifié (100%).

Pour chaque méthode de marche chromosomique, une présentation schématique de la position potentielle de départ et de la direction, appliquée sur la cassette transgénique du riz Bt, est illustrée par les flèches jaune (t35S pCAMBIA), verte (p35S-R), bleue (p35S-F), mauve (tNOS-R) et rose (tNOS-F). LB (bord gauche); t35S (CaMV 35S terminator); hpt (hygromycin phosphotransferase gene); p35S (CaMV 35S promoter); lacZ (LacZ alpha fragment); pUBI (maize ubiquitin promoter); Cry1B (synthetic Cry1B gene); tNOS (Agrobacterium tumefaciens nopaline synthase terminator); RB (bord droit); plant (génomme de la plante) (Schéma adapté de Breitler et al., 2004).

Ces méthodes de marche chromosomique ont été initialement développées sur du matériel pur (100% de grains de riz transgénique Bt). Leurs performances ont alors été testées avec succès en termes de sensibilité (partant de 100% à 0.005% de la cible) et aussi d'applicabilité sur une série de matrices alimentaires modèles (farine de riz, nouilles de riz, mélange riz-maïs, grains de maïs et poudre de maïs) communément rencontrées en analyse de routine OGM (Fraiture et al., 2014, 2015a et 2015b). La stratégie de marche chromosomique proposée est donc un outil moléculaire crucial qui fournit rapidement des résultats (en trois jours ouvrable) et qui est facilement applicable dans les laboratoires de contrôle, dans le but de démontrer la présence d'OGM dans n'importe quelle matrice alimentaire donnée. Cette stratégie est actuellement implémentée pour les analyses OGM de routine dans les échantillons d'alimentation humaine et pour bétail dans le LNR-OGM belge (Laboratoire PBB, Institut Scientifique de Santé Publique).

## Remerciement

Les recherches sous-jacentes à ces résultats ont reçu un financement du Service public fédéral belge Santé publique, Sécurité de la Chaîne alimentaire et Environnement au titre du contrat UGMMONITOR (convention RF 11/6242). Les auteurs souhaitent également remercier Emmanuel Guiderdoni (CIRAD, UMR AGAP, Biological Systems department, Montpellier, France) pour sa gentillesse de fournir les grains de riz.



## Références

1. Biosafety Cleaning House. URL <<http://bch.cbd.int/database/organisms/>>.
2. Breitler, J. C., Vassal, J. M., del Mar Catala, M., Meynard, D., Marfa, V., Melé, E., Royer, M., Murillo, I., San Segundo, B., Guiderdoni, E. & Messeguer, J. (2004). Bt rice harbouring cry genes controlled by a constitutive or wound-inducible promoter: protection and transgene expression under Mediterranean field conditions. *Plant Biotechnology Journal*, 2, 417-430.
3. Cambia, Canberra, Australia. URL <[http://www.cambia.org/daisy/bioforge\\_legacy/3724.html](http://www.cambia.org/daisy/bioforge_legacy/3724.html)>.
4. Center for Environmental Risk Assessment (CERA). URL <[http://www.cera-gmc.org/?action=gm\\_crop\\_database](http://www.cera-gmc.org/?action=gm_crop_database)>.
5. ENGL ad hoc working group on "unauthorised GMOs" (2011). Overview on the detection, interpretation and reporting on the presence of unauthorised genetically modified materials. URL <<http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/doc/2011-12-12%20ENGL%20UGM%20WG%20Publication.pdf>>.
6. Fraiture, M. A., Herman, P., Taverniers, I., De Loose, M., Deforce, D., Roosens, N. H. (2014). An innovative and integrated approach based on DNA walking to identify unauthorised GMOs. *Food Chemistry*, 147:60-69.
7. Fraiture, M. A., Herman, P., Taverniers, I., De Loose, M., Van Nieuwerburgh, F., Deforce, D., Roosens, N. H. (2015a). Validation of a sensitive DNA walking strategy to characterize unauthorised GMOs using model food matrices mimicking common rice products. *Food Chemistry*, 173:1259-1265.
8. Fraiture, M. A., Herman, P., Lefèvre, L., Taverniers, I., De Loose, M., Deforce, D., Roosens, N. H. (2015b). High coverage and integrated DNA walking system to characterize GMOs in food/feed matrices. (submitted).
9. GMDD. URL<<http://gmdd.shgmo.org/index/search>>
10. GMO Compass. URL <<http://www.gmo-compass.org/eng/gmo/db/>>.
11. IRRI. <<http://www.irri.org/our-work/research>>
12. Komori, T., Imayama, T., Kato, N., Ishida, Y., Ueki, J. & Komari, T. (2007). Current Status of Binary Vectors and Superbinary Vectors. *Plant Physiology*, 145, 1155-1160.
13. Scopus (transgenic rice). URL <<http://www.scopus.com/home.url>>.

MarieAlice.Fraiture@wiv-isp.be et Nancy.Roosens@wiv-isp.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)
27-29.01.2016	HTC-14 14th International Symposium on Hyphenated Techniques in Chromatography and Separation Technology	Ghent, Belgium	<a href="http://www.ldorganisation.com/v2/produits.php?langue=english&amp;cle_menus=1238916061">http://www.ldorganisation.com/v2/produits.php?langue=english&amp;cle_menus=1238916061</a>
29.02.2016 - 01.03.2016	14th International Fresenius Conference Food Safety and Dietary Risk Assessment	Cologne, Germany	<a href="http://www.akademie-fresenius.com/english/konferenz/output.php?kurs=539">http://www.akademie-fresenius.com/english/konferenz/output.php?kurs=539</a>
11-13.04.2016	IDF International Symposium on Cheese Science and Technology & the IDF Symposium on Concentration and Drying Technologies of Dairy Products	Dublin, Ireland	<a href="http://www.idfingredientsandcheese2016.com/">http://www.idfingredientsandcheese2016.com/</a>
9-10.05.2016	Eurachem International Workshop on "Method Validation – Current practices and future challenges"	Ghent, Belgium	<a href="http://www.belab-eurachem2016.com/">http://www.belab-eurachem2016.com/</a>
11.05.2016	5th International Symposium Mycotoxins and Toxigenic Moulds: Challenges and Perspectives	Ghent, Belgium	<a href="http://www.mytox.be">www.mytox.be</a>
17.05.2016	68th International Symposium on Crop Protection	Ghent, Belgium	<a href="http://www.ugent.be/bw/crop-protection/en/iscp">http://www.ugent.be/bw/crop-protection/en/iscp</a>
23-25.05.2016	Euroresidue conference (ER VIII) Conference on Residues of Veterinary Drugs in Food	Egmond aan Zee, the Netherlands	<a href="http://www.euroresidue.nl/">http://www.euroresidue.nl/</a>
30.05.2016 – 3.06.2016	IDF Analytical Week 2016	Copenhagen, Denmark	<a href="http://www.copenhagen2016.dk/">http://www.copenhagen2016.dk/</a>
6-9.06.2016	WMFmeetsIUPAC Joint meeting of the 9th conference of The World Mycotoxin Forum and the XIVth IUPAC International Symposium on Mycotoxins	Winnipeg, Canada	<a href="http://www.wmfmeetsiupac.org/2016/">http://www.wmfmeetsiupac.org/2016/</a>

20-21.06.2016	18th International Fresenius AGRO Conference Behaviour of Pesticides in Air, Soil and Water	Mainz, Germany	<a href="http://www.akademie-fresenius.com/english/konferenz/output.php?kurs=529">http://www.akademie-fresenius.com/english/konferenz/output.php?kurs=529</a>
7-9.09.2016	IDF Mastitis Conference 2016	Cité des Congrès, Nantes, France	<a href="http://www.idfmastitis2016.com/en/">http://www.idfmastitis2016.com/en/</a>
18-21.09.2016	130th AOAC Annual Meeting & Exposition	Dallas, Texas, USA	<a href="http://www.aoac.org/iMIS15_Prod/AOAC/Mtgs/16AM/AOAC_Member/MtgsCF/16AM-CF/16AMCFSSM.aspx?hkey=93d482bb-598c-4b59-84f0-a01e96f7f07d">http://www.aoac.org/iMIS15_Prod/AOAC/Mtgs/16AM/AOAC_Member/MtgsCF/16AM-CF/16AMCFSSM.aspx?hkey=93d482bb-598c-4b59-84f0-a01e96f7f07d</a>
26-28.09.2016	4th International Conference on Responsible Use of Antibiotics in Animals		<a href="http://www.bastiaanse-communication.com/html/upcoming.html">http://www.bastiaanse-communication.com/html/upcoming.html</a>
10-12.10.2016	5th Beneficial Microbes Conference Beneficial impact of pre- and probiotics on human and animal health		<a href="http://www.bastiaanse-communication.com/html/upcoming.html">http://www.bastiaanse-communication.com/html/upcoming.html</a>
16-21.10.2016	IDF World Dairy Summit	Rotterdam, The Netherlands	<a href="http://www.idfwds2016.com/">http://www.idfwds2016.com/</a>
7-9.11.2016	The RME Conference Series – 11th conference Food Feed Water Analysis: innovations and breakthroughs!	The Netherlands	<a href="http://www.bastiaanse-communication.com/html/upcoming.html">http://www.bastiaanse-communication.com/html/upcoming.html</a>





# Labinfo