



Labinfo

Publication destinée aux laboratoires de sécurité alimentaire agréés

- 4 Analyse des éléments traces, où est la limite ?
- 12 Impact des changements climatiques sur les toxines marines
- 16 Analyse des allergènes alimentaires : état de l'art et perspectives pour le contrôle des aliments
- 24 Analyse des pignons de pin responsables du PNS (syndrome du pignon de pin)
- 32 Détection des STEC excrétés par les bovins, au moyen de la Droplet Digital PCR : une détection à l'aide de milliers de gouttelettes
- 37 L'utilisation de la PCR quantitative en temps réel pour le dénombrement des *Campylobacter* spp thermophiles sur les carcasses de volailles
- 41 Infections à *Salmonella*: Techniques d'identification aboutissant aux succès des enquêtes
- 48 Workshops & Symposia



LabInfo

Publication destinée aux laboratoires de sécurité alimentaire agréés

Equipe de rédaction

Dirk Courtheyn, Alain Dubois, Marc Evrard, Geert Janssens et Marie-Christine Wilem

Ont participé à ce numéro :

Bert Matthijs, Karlien Cheyns, Nadia Waegeneers, Heidi Demaegdt, Ann Ruttens, Nathalie Gillard, Anne-Catherine Huet, Mélanie Planque, Marjolein Vandekerckhove, Isabel Taverniers, Jeroen Vancutsem, Koen Doms, Hans Rediers, Bavo Verhaegen, Els Van Coillie, Koen De Reu, David Triest, Alexandra Duarte, Katelijne Dierick, Nadine Botteldoorn, Sophie Bertrand, Wesley Mattheus, Pieter-Jan Ceyskens, Mathieu Gand, Raymond Vanhoof, Sarah Denayer, Nancy Roosens et Sigrid De Keersmaecker

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,

Les laboratoires nationaux de référence (LNR) constituent l'un des piliers assurant le bon fonctionnement du réseau de laboratoires auxquels l'AFSCA fait appel. Afin d'optimiser la prestation de services des LNR en fonction des besoins des diverses parties prenantes, celles-ci ont été sondées par l'administration des Laboratoires dans le courant de l'année 2016 à propos d'une possible redéfinition des attributions des LNR.

Dans le cadre de cette enquête, plusieurs directions de l'AFSCA ont été interviewées (la DG Politique de Contrôle, la DG Contrôle et les services de l'Administrateur délégué), tandis que différents laboratoires ont également été interrogés (les 5 laboratoires AFSCA et un panel aléatoire de laboratoires agréés, de LNR et de laboratoires de référence de l'UE).

Cette enquête n'a pas seulement été instructive, elle s'est également révélée une excellente opportunité de communication avec toutes les parties concernées. Nous nous sommes aperçus que les différentes parties prenantes ne connaissaient parfois pas suffisamment le rôle et les tâches précises des LNR et de l'administration des Laboratoires, si bien qu'une meilleure communication sera menée à ce sujet au sein des groupes de pilotage et de communication.

Les différentes parties prenantes se sont avérées avoir des attentes différentes : la DG Politique de Contrôle, par exemple, est surtout intéressée par une information rapide sur l'évolution des possibilités analytiques et sur la détection précoce des dangers dans la chaîne alimentaire ; la DG Contrôle a essentiellement besoin d'analyses rapides et fiables, ainsi que de formations pratiques en matière d'échantillonnage et d'interprétation des résultats ; les laboratoires, quant à eux, s'attendent principalement à recevoir des informations et un support technique dans l'implémentation de méthodes.

Globalement parlant, une grande satisfaction a été enregistrée à propos du fonctionnement des LNR. À côté de ce qui est déjà prévu et mis en oeuvre dans le cadre des conventions entre l'AFSCA et les LNR, un grand nombre d'idées utiles ont également émergé de l'enquête. Il y a encore beaucoup à faire sur ce plan mais, pour bon nombre des demandes formulées, nous essayons déjà de les concrétiser dans les nouvelles conventions. Elles seront également à l'ordre du jour des groupes de pilotage et groupes de communication. Les résultats de l'enquête serviront encore, dans le futur, de fil conducteur pour le travail mené par l'administration des Laboratoires en collaboration avec les LNR et les laboratoires en général.

Les nouveaux LNR Chimie seront eux aussi annoncés à peu près en même temps que la publication de ce nouveau numéro de Labinfo. Vous ne pourrez pas passer à côté de l'une des nouveautés concernant les nanotechnologies.

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

Bert Matthijs
Directeur général Laboratoires

Analyse des éléments traces, où est la limite ?

Karliën Cheyns, Nadia Waegeneers, Heidi Demaegdt et Ann Ruttens

Operational Direction Chemical Safety of the Food Chain
 Veterinary and Agrochemical Research Centre (CODA-CERVA)
 Leuvensesteenweg 17, 3080 Tervuren, Belgium

Caractères essentiels et toxiques des éléments traces

On retrouve plusieurs définitions des « éléments traces ». Dans cet article, les éléments traces sont considérés comme des éléments minéraux apparaissant dans les tissus vivants, les denrées alimentaires et les régimes en quantités relativement faibles ou à l'état de « traces ». Ils sont connus comme les 78 éléments (Figure 1) du tableau périodique qui restent après avoir exclu les six éléments majeurs (C, Ca, H, N, O et P) et les six mineurs (Cl, K, Mg, Na, S et Si) du corps humain, ainsi que les six gaz nobles (Ar, He, Kr, Ne, Rn et Xe). La concentration des éléments traces dans les tissus vivants varie de 0,01 à 100 mg kg⁻¹.

1 H																	2 He	
3 Li	4 Be											5 B	6 C	7 N	8 O	9 F	10 Ne	
11 Na	12 Mg											13 Al	14 Si	15 P	16 S	17 Cl	18 Ar	
19 K	20 Ca	21 Sc	22 Ti	23 V	24 Cr	25 Mn	26 Fe	27 Co	28 Ni	29 Cu	30 Zn	31 Ga	32 Ge	33 As	34 Se	35 Br	36 Kr	
37 Rb	38 Sr	39 Y	40 Zr	41 Nb	42 Mo	43 Tc	44 Ru	45 Rh	46 Pd	47 Ag	48 Cd	49 In	50 Sn	51 Sb	52 Te	53 I	54 Xe	
55 Cs	56 Ba	57-70 *	71 Lu	72 Hf	73 Ta	74 W	75 Re	76 Os	77 Ir	78 Pt	79 Au	80 Hg	81 Tl	82 Pb	83 Bi	84 Po	85 At	86 Rn
87 Fr	88 Ra	89-102 **	103 Lr	104 Rf	105 Db	106 Sg	107 Bh	108 Hs	109 Mt	110 Uun	111 Uuu	112 Uub	114 Uuq					
* Lanthanide series		57 La	58 Ce	59 Pr	60 Nd	61 Pm	62 Sm	63 Eu	64 Gd	65 Tb	66 Dy	67 Ho	68 Er	69 Tm	70 Yb			
** Actinide series		89 Ac	90 Th	91 Pa	92 U	93 Np	94 Pu	95 Am	96 Cm	97 Bk	98 Cf	99 Es	100 Fm	101 Md	102 No			

Figure 1 : Tableau périodique des éléments classés comme suit : les 6 éléments majeurs (rouge), les 6 éléments mineurs (orange), les 6 gaz nobles (vert) et les 78 éléments traces

Il est prouvé pour plusieurs de ces éléments traces qu'ils sont essentiels à l'homme (par ex. : Co, Cr, Cu, Zn, Fe, I, Mo, et Se) alors que pour d'autres, cette caractéristique n'est pour l'instant pas connue. Certains de ces éléments peuvent également être essentiels (par ex. : B, Mn, Ni, Sn et V) mais d'autres sont considérés comme potentiellement toxiques (par ex. : As, Al, Cd, F, Hg et Pb). Il est difficile de désigner les éléments comme étant « toxiques » puisque c'est la dose qui fait le poison. En effet, une substance ne peut produire un effet nuisible associé à ses propriétés toxiques que si elle atteint un système biologique du corps à une concentration suffisante (dose assez élevée) [1]. Proportionnellement, les éléments essentiels deviennent également toxiques à des concentrations élevées.

Les connaissances en matières de toxicité de certains éléments traces existaient déjà dans l'antiquité [2]. Même si les Romains étaient conscients de la toxicité du plomb (Pb), ils aimaient tellement ses différentes utilisations qu'ils minimisaient le danger qu'il représentait. D'aucuns prétendent que l'empoisonnement au plomb a contribué au déclin de l'Empire romain. La toxicité aiguë de l'arsenic était bien connue au Moyen Âge puisqu'il était souvent utilisé comme technique de meurtre. Comme les symptômes sont similaires à ceux du choléra, une maladie commune à l'époque, l'empoisonnement à l'arsenic était rarement détecté. Au cours des décennies qui ont suivi la Seconde Guerre mondiale, l'environnement et la santé publique y afférente sont devenus une question d'intérêt public. Plusieurs incidents ont attiré beaucoup d'attention sur la toxicité de certains éléments traces.

- En 1947, une maladie rhumatismale douloureuse et inhabituelle a été détectée chez 44 patients d'un village situé sur les rives de la rivière Jintsu, au Japon. Au cours des années suivantes, elle a été dénommée comme la maladie « itai-itai » (signifiant « aie-aie »), appelée ainsi d'après les cris émis par les patients qui souffraient de déformations squelettiques douloureuses. La maladie était provoquée par la concentration élevée en Cadmium dans la région, qui résultait d'activités minières intensives menées dans les montagnes situées aux alentours.
- De 1932 à 1968, du méthylmercure présent dans l'eau résiduelle industrielle d'une usine chimique a été rejeté dans la baie de Minamata au Japon. Les patients de cette région ont progressivement souffert d'un affaiblissement des muscles, une perte de vision, une déficience des fonctions cérébrales et pour finir d'une paralysie, ce qui dans de nombreux cas a donné lieu à un coma et au décès. Cette maladie était connue comme la maladie de Minamata et après des recherches poussées, il a été révélé en 1959 que les symptômes étaient dus à la consommation de poisson et d'autres aliments contaminés par du méthylmercure.

Le monde scientifique a suivi l'intérêt public ; le caractère essentiel et toxique des éléments traces est donc devenu un sujet populaire de recherches. Parallèlement, le besoin d'outils analytiques pour l'analyse de ces éléments s'est fait sentir. Aujourd'hui, la liste établie par l'OMS des principales substances chimiques qui posent un problème de santé publique comprend quatre éléments traces (As, Cd, Pb, Hg). Vu que la nourriture et les boissons représentent pour l'homme une voie d'exposition importante aux éléments traces toxiques et essentiels, l'analyse de ces matrices devenait indispensable.



Analyse des éléments traces dans les denrées alimentaires et les aliments pour animaux

Les premières méthodes d'analyse

Les premières observations de chimie analytique sur les éléments traces ont été faites en 1820 à l'aide de méthodes gravimétriques utilisant du PbS pour l'analyse du plomb. Un siècle plus tard, en 1925, Helmut Fischer a réussi à détecter des éléments traces au moyen d'un procédé de dithizone [3]. En tant que réactif, la dithizone est capable d'indiquer la présence d'éléments traces en termes qualitatifs et quantitatifs. Après la liaison avec certains ions d'éléments, des complexes colorés, qui sont solubles dans des solvants organiques non polaires, se forment à l'intérieur de la molécule. La coloration de ces solutions est très intense, cette coloration particulière est déterminée par le rayon atomique du métal présent dans le complexe. Le temps de réaction de ces éléments traces varie. Pour cette raison, les concentrations en éléments peuvent prendre différentes colorations. Par conséquent, outre les conclusions qualitatives (le réactif dithizone se lie au Cu, Zn, Cd, Hg, Pb, Mn, Co, Ni), des indications semi-quantitatives relatives au contaminant étaient également possibles à un faible niveau de parties par million (ppm) ou même au niveau de parties par milliard (ppb) (Figure 4). Des variantes améliorées de cette méthode ont été utilisées pour une quantification métallique jusque dans les années 60 [4,5].

Spectrométrie d'absorption atomique (AAS)

Durant les années 60, les connaissances acquises sur la spectrométrie (partant de la découverte de Newton en 1672 selon laquelle la lumière du soleil pouvait être séparée en différentes couleurs lors du passage à travers un prisme) étaient employées à développer des méthodes en vue de l'analyse des éléments traces dans des matrices biologiques. La spectrométrie d'absorption atomique était née, celle-ci est basée sur le principe que les électrons d'atomes libres à l'état gazeux peuvent être promus à des orbites supérieures par l'absorption d'une quantité définie d'énergie (radiation d'une longueur d'onde donnée). Cette énergie (longueur d'onde) est spécifique à un élément donné, ce qui permet d'identifier les éléments, en plus de les quantifier [6].

Un spectromètre d'absorption atomique typique se compose d'une source de lumière afin de fournir des photons (source d'énergie), d'une cellule d'atomisation pour créer des atomes d'analyte libres, d'un monochromateur afin d'isoler la longueur d'onde voulue et d'un tube photomultiplicateur (détecteur). Le rôle de ce dernier est de convertir un signal lumineux en un signal électrique. Les premiers modèles AAS utilisaient des atomiseurs de flammes (F-AAS). Les éléments sont amenés dans la flamme sous forme d'aérosol émis par un nébuliseur. Dans la flamme, l'échantillon est séché, vaporisé, atomisé et ionisé. Le F-AAS est sujet aux effets d'interférence spectrale, physique et chimique pouvant donner lieu à des résultats inexacts. Les limites de détection (LOD) dans la F-AAS sont limitées au niveau ppm en raison de l'inefficacité relative de l'introduction d'échantillons par nébulisation pneumatique, combinée avec le séjour relativement court des atomes d'analyte dans le faisceau et leur dilution lors de la présence d'un excès important de gaz de flammes (Figure 4) [7,8].

ICP-OES - Spectroscopie d'émission optique par plasma à couplage inductif

Les connaissances relatives à la spectroscopie d'émission optique (OES) ⁽¹⁾ datent du 18^{ème} siècle. À cette époque, un jeune scientifique a observé l'apparition d'une lumière jaune éclatante émise par une flamme, elle-même produite en brûlant un mélange d'alcool et de sel marin [9]. Lorsque l'alcool ne contenait pas de sel, la couleur jaune disparaissait. La technique est basée sur le fait que les atomes qui sont mis dans un état d'excitation émettent des photons avec un spectre spécifique lorsqu'ils retournent à leur état de base. Une des premières utilisations de la technique avait été la vérification de la découverte de nouveaux atomes au début du 20^{ème} siècle. Au milieu du 20^{ème} siècle, la technique a été optimisée et a facilité la quantification des éléments traces. La détermination des métaux était généralement effectuée à l'aide d'arcs ou d'étincelles (décharges électriques) pour exciter les atomes alors que les flammes semblaient être plus appropriées pour les alcalins et autres éléments faciles à exciter.

Dans les années 60 et 70, aussi bien la spectroscopie d'émission atomique à flammes que celle à arcs/étincelles ont connu une baisse de popularité en raison des excellents résultats obtenus avec les technologies AAS. Toutefois, les techniques AAS ont l'inconvénient majeur qu'elles ne mesurent, en règle générale, qu'un seul élément à la fois et que la gamme d'étalonnage est limitée. C'est pourquoi, lorsque l'utilisation d'un plasma à couplage inductif (ICP) à pression atmosphérique a été prouvée en 1964 comme étant utile pour des analyses élémentaires par OES [10], la technique a connu un regain d'intérêt. Le plasma fournissait un degré élevé de stabilité, était capable d'exciter plusieurs éléments et donnait une sensibilité croissante par rapport aux flammes OES. Depuis 1973, la technique était largement utilisée. De plus, un nombre important de chercheurs académiques, gouvernementaux et industriels ont participé au développement et à l'optimisation de l'ICP.

(1) Ook gekend onder atoomemissiespectroscopie (AES)



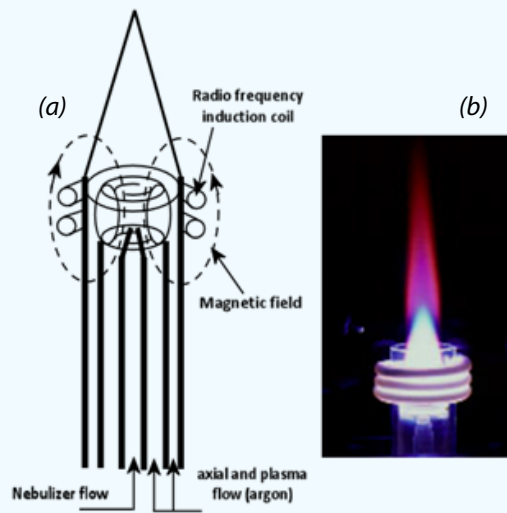


Figure 2 : (a) Aperçu schématique d'une torche, constituée de trois tubes concentriques en quartz entourés par une bobine en cuivre de radiofréquence, refroidie par l'eau ; (b) plasma à couplage inductif.

L'argon de l'ICP est formé dans une torche spécialement conçue à cet effet, constituée de trois tubes concentriques en quartz entourés par une spire en cuivre de radiofréquence, refroidie par l'eau (Figure 2a). Trois flux d'argon sont fournis. Le gaz interne ou porteur transporte l'échantillon aérosol vers l'ICP, tandis que le gaz externe aide à former le plasma et l'empêche de faire fondre la torche. Lorsque l'énergie de la radiofréquence est fournie à la spire, un champ magnétique intense est créé. Les électrons germes qui sont générés par une étincelle émanant d'une spire Tesla sont accélérés par le champ et heurtent les atomes d'argon, produisant un plasma autonome (Figure 2b). Les interférences chimiques sont effectivement éliminées car l'énergie du plasma est beaucoup plus grande que celle d'une flamme, de sorte que même des éléments formant des oxydes réfractaires sont efficacement atomisés. Par contre, le chevauchement des lignes spectrales est un problème beaucoup plus important dans l'ICP-OES que dans le F-AAS car la température plus élevée de l'environnement signifie que presque tous les éléments présents dans le plasma auront des atomes (et ions) à différents états d'excitation. La principale limitation de l'ICP-OES est que les limites de détection atteignables, à savoir généralement des niveaux ppm ou légèrement plus bas, sont insuffisantes pour certaines applications (Figure 4). Ce problème a été résolu il y a 25 ans en couplant l'ICP au spectromètre de masse [11].

ICP-MS - Spectrométrie de masse avec plasma à couplage inductif

Les spectromètres de masse quadripolaires (MS) étaient déjà utilisés dans le domaine de la chromatographie en phase gazeuse et le défi majeur du développement de l'ICP-MS était l'extrait d'ions du plasma dense et brûlant dans l'environnement à vide poussé de l'analyseur de masse. Les interfaces d'instruments modernes utilisent à cet effet deux cônes en platine ou en nickel refroidis par l'eau (Figure 3). L'ICP-MS a une limite de détection équivalente à celle de l'ET-AAS (ppb ou plus bas, Figure 4) mais a en outre la capacité de réaliser une analyse multiélémentaire et isotopique. Les inconvénients généraux incluent le dépôt d'une matière solide au bout des cônes, surtout lorsque les solutions des échantillons analysés contiennent des concentrations élevées de solides dissous. Cela peut être contré en diluant l'échantillon, avec une réduction concomitante de la limite de détection. Plus importantes sont l'apparition d'interférences isobariques (par ex. : celles de ^{40}Ar sur la mesure de ^{40}Ca) et d'ions polyatomiques issus du plasma ou de la matrice de l'échantillon au même rapport/masse que l'ion de l'analyte.

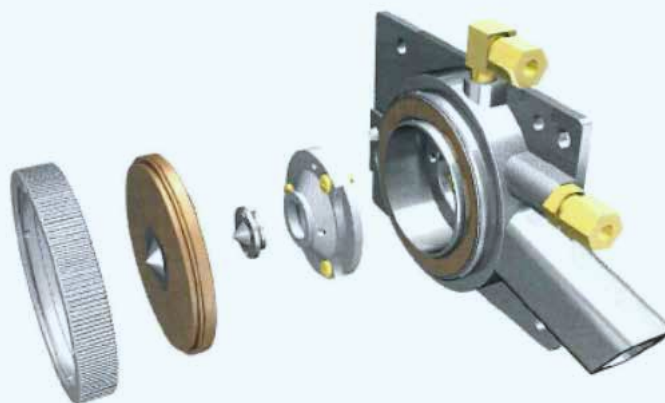


Figure 3 : Cônes typiques (sampler et skimmer) utilisés dans l'appareillage de l'ICP-MS comme interface entre la pression atmosphérique et le vide poussé du quadripôle.

La dernière génération d'instruments commerciaux ICP-MS comprend des outils pour contrer l'interférence d'ions polyatomiques. Les instruments modernes font usage d'une cellule de collision/réaction où un gaz inerte (He) ou un réactif (H_2 , NH_3 , O_2) sépare les ions en leurs atomes constitutifs ou altèrent la masse des atomes par réaction. Les systèmes alternatifs de l'ICP-MS avec un senseur magnétique (ICP-MS à secteur magnétique ou de haute résolution), un spectromètre à temps de vol (TOF-ICP-MS) ou un second quadripôle (ICP-MS-MS) sont mis en place afin de contrer les problèmes de quantification liés aux interférences. Toutefois, le système basé sur le quadripôle unique reste le système le plus disponible sur le marché et offre de nos jours une solution pour la plupart des consommateurs.

Analyse par activation neutronique

À côté des techniques analytiques spectroscopiques, une autre technique pour l'analyse élémentaire a été découverte en 1936 [12]: L'analyse par activation neutronique se base sur des transitions nucléaires. Les scientifiques ont découvert que les échantillons contenant certains éléments de terres rares devenaient très radioactifs après une exposition à une source de neutrons. Pour réaliser une analyse NAA, l'échantillon est placé dans un réacteur nucléaire à l'aide d'un système de commande à distance et est irradié par un flux connu de neutrons thermiques. Les isotopes stables peuvent capturer ces neutrons et être transformés en radionucléides. L'échantillon est alors enlevé et les produits d'activation sont quantifiés, généralement par spectrométrie gamma. L'analyse par activation neutronique instrumentale (INAA) fut la première technique capable de réaliser une analyse multiélémentaire non-destructive sur de petits échantillons solides avec une limite de détection en parties par million. Les désavantages sont l'exigence d'avoir des unités spécialisées d'irradiation et du personnel hautement qualifié, ce qui limite l'accessibilité de la technique aux instituts nationaux ou aux employées ayant accès à un réacteur local de recherche.

Les techniques susmentionnées sont couramment utilisées pour l'analyse des éléments traces dans les denrées alimentaires et les aliments pour animaux. À des fins géologiques et archéologiques, il existe davantage de techniques (par ex.: spectrométrie à fluorescence atomique avec excitation laser, fluorescence X (XRF) et spectroscopie par claquage induit par éclair laser).



De nos jours...

On observe une tendance croissante de l'utilisation d'instruments modernes ICP-MS (avec cellule de collision/réaction) dans les laboratoires de contrôle. Par exemple, lors du dernier essai d'aptitude (2016) du Laboratoire National de Référence belge sur les éléments traces dans les denrées alimentaires et les aliments pour animaux, 9 des 10 participants ont utilisé la technique de l'ICP-MS pour une analyse de l'As, du Cd et du Pb alors qu'en 2010, seuls 3 des 8 laboratoires l'avaient utilisée. Afin de protéger les citoyens européens, la Commission européenne fixe des limites pour les éléments traces présents dans les denrées alimentaires et les aliments pour animaux qui sont aussi faibles que raisonnablement possible. De récentes mises à jour de la législation européenne sur certains contaminants dans les denrées alimentaires (CE 1881/2006) [13,14,15] fixent la teneur maximale pour le Cd et le Pb de respectivement 5 µg/kg et 10 µg/kg dans les préparations pour nourrissons sous forme liquide. Vu l'ancienne règle (selon le Règl. CE 2007/333) [16] selon laquelle les limites de quantification ($LOQ=3.3*LOD$) dans les denrées alimentaires devraient être au maximum d'un à deux cinquièmes de la teneur maximale, les laboratoires de contrôles officiels devraient être capables de quantifier le Cd et le Pb d'un 1 µg/kg à 4 µg/kg. Même avec des instruments modernes ICP-MS, il est difficilement réalisable d'atteindre ces critères de performance. Cela a donné lieu à une révision des critères de performance et pour les faibles teneurs maximales (≤ 10 µg/kg), la limite de quantification peut désormais (depuis avril 2016) être de deux cinquièmes ou égale à la teneur maximale [17].

Bien que des instruments analytiques modernes ont rendu possible la détection des éléments traces à de très faibles concentrations, la législation fait toujours face aux limites des possibilités analytiques actuelles.

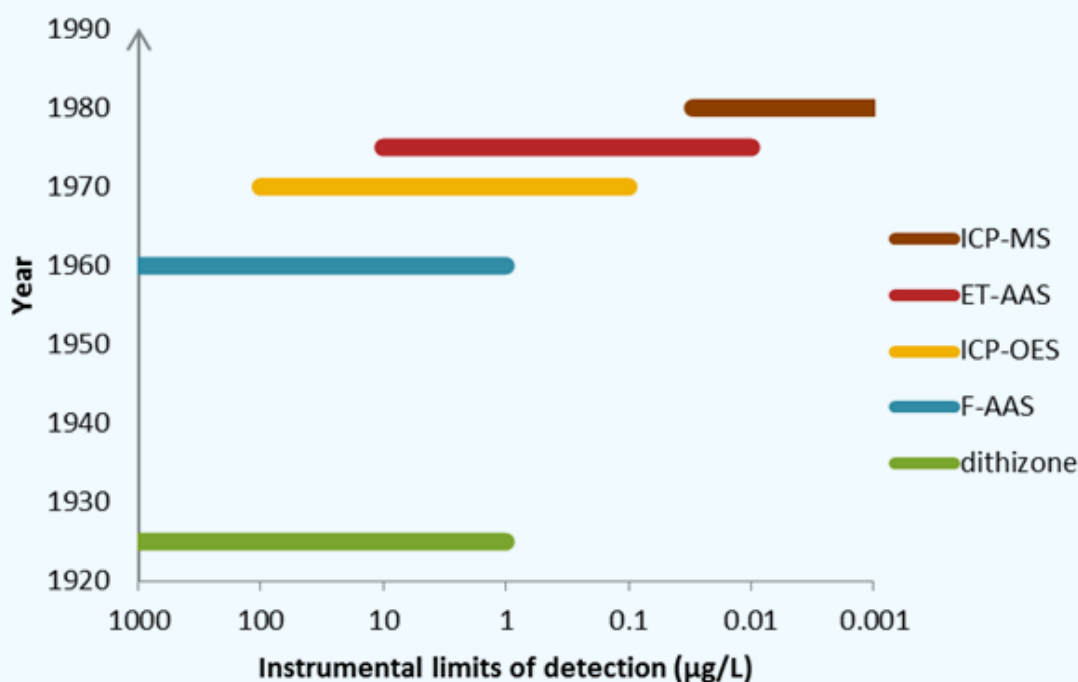


Figure 4 : Aperçu historique des méthodes analytiques populaires pour la quantification des éléments traces avec des détections de limite instrumentales (µg/L). Les facteurs de dilution nécessaires pour la préparation d'échantillons traduisent ces valeurs LOD en valeurs LOD dans les matrices.

Bibliographie

- (1) Paracelsus. Die dritte Defension wegen des Schreibens der neuen Recepte. Septem Defensiones 1538.
- (2) Hernberg, S. Lead poisoning in a historical perspective. *Am. J. Ind. Med.* 2000, 38 (3), 244–254.
- (3) Fischer, H. Compounds of diphenylthiocarbazon with metals and their use in analysis. *Wiss. Veröffentlich. Siemens-Konzern* 1925, 4 (158).
- (4) Synder, L. J. Improved Dithizone Method for Determination of Lead. *Anal. Chem.* 1947, 19 (9), 684–687.
- (5) Saltzman, B. E. Colorimetric Microdetermination of Cadmium with Dithizone. *Anal. Chem.* 1953, 25 (3), 493–496.
- (6) Koirtjohann, S. R. A history of atomic absorption spectroscopy from an academic perspective. *Anal. Chem.* 1991, 63 (21), 1024A – 1031A.
- (7) Alloway, J. B. *Heavy Metals in Soils; Environmental Pollution*, 2013.
- (8) Barron, A. R. *Physical Methods in Chemistry and Nano Science*; 2014.
- (9) Melvin, T.; Brashear, J. A. *Observations on light and colours (1752); 1914.*
- (10) Greenfield, S.; Jones, I. L. I.; Berry, C. T. High pressure plasmas as spectroscopic emission sources. *Analyst* 1964, 89, 713–720.
- (11) Houk, R. S.; Fassel, V. A.; Flesch, G. D.; Svec, H. J.; Gray, A. L.; Taylor, C. E. Spectrometric Determination of Trace Elements. *Anal. Chem.* 1980, 52, 2283–2289.
- (12) Hevesy, G.; Levi, H. *Danske Videnske. Selsk Mat fys Medd* 1936, 14 (5).
- (13) European Commission. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Off. J. Eur. Union* 2006, L364 (78), 5–24.
- (14) European Commission. Commission Regulation (EU) No 488/2014 of 12 May 2014 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of cadmium in foodstuffs. *Off. J. Eur. Union* 2014, L138 (75), 75–79.
- (15) European Commission. Commission Regulation (EU) 2015/1006 of 25 June 2015 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of inorganic arsenic in foodstuffs. *Off. J. Eur. Union* 2015, L161 (14), 1993–1995.
- (16) European Commission. Commission Regulation (EC) No 333/2007 of 28 March 2007 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of lead, cadmium, mercury, inorganic tin, 3-MCPD and benzo(a)pyrene in foodstuffs. *Off. J. Eur. Union* 2007, No. 333, 29–38.
- (17) European Commission. Commission Regulation (EU) 2016/582 of 15 April 2016 amending Regulation (EC) No 333/2007 as regards the analysis of inorganic arsenic, lead and polycyclic aromatic hydrocarbons and certain performance criteria for analysis. *Off. J. Eur. Union* 2016, L 101/3.

karlien.cheyns@coda-cerva.be



Impact des changements climatiques sur les toxines marines

Nathalie Gillard et Anne-Catherine Huet

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

Toxines marines émergentes

Les toxines marines représentent un très large groupe de toxines produites par des dinoflagellés, des algues rouges, des diatomées et aussi des bactéries. A côté des toxines bien connues (toxines amnésiantes ou ASPs pour *Amnesic Shellfish Poisoning*, toxines diarrhéiques ou DSPs pour *Diarrhetic Shellfish Poisoning toxins* et toxines paralysantes ou PSPs pour *Paralytic Shellfish Poisoning toxins*), de nouvelles toxines ont été découvertes au fil des années, tels que les azaspiracides (AZs), yessotoxines (YTXs), pectenotoxines (PTXs) et plus récemment les pinnatoxines, palytoxines, ciguatoxines, tétrodoxines, brevétoxines et spirolides.

Cette émergence des toxines marines peut correspondre à 2 situations : l'émergence de nouvelles toxines/ analogues ou la détection de toxines connues mais dans des zones géographiques dans lesquelles elles n'avaient jamais été observées.

Les tétrodoxines sont une classe de neurotoxines extrêmement toxiques. Contrairement aux autres toxines marines, leur accumulation dans les produits de pêche (poissons et mollusques) n'a jamais été reliée à des microalgues mais à des bactéries. Les cas d'intoxications par des TTXs a longtemps été limitée à l'Asie (Japon, Chine, Hong Kong, Thaïlande, Bangladesh). En Europe, les TTXs ont pour la première fois été détectées en 2007 en Espagne [1] et plus récemment en 2012 en Grèce [2], en 2013 en Angleterre [3] et en 2016 aux Pays-Bas.

Les ciguatoxines représentent également une catégorie de toxines émergentes. Leur présence a longtemps été rapportée uniquement dans les zones tropicales (caraïbes, océans indien et pacifique) mais récemment également aux Canaries, en Mer Méditerranée et en Australie [4]. Il est important de souligner qu'entre 50.000 et 500.000 intoxications sont dues chaque année aux ciguatoxines, ce qui en fait la plus importante cause de maladie d'origine non-bactérienne liée à la consommation de poisson [5].

Les imines cycliques (gymnodimines, pinnatoxines, pteriatoxines, spirolides) sont une nouvelle classe de toxines marines dont l'occurrence grandissante dans les eaux chaudes océaniques et la toxicité potentielle nécessite de maintenir une vigilance lors des monitorings [6].

Causes possibles de cette émergence : les changements climatiques ?

Le changement climatique constitue une menace considérable pour la survie des humains et des animaux, avec certaines conséquences directes connues, tels que la fonte des glaciers, la hausse du niveau des mers et le réchauffement des océans. D'autres conséquences sont moins évidentes mais pourraient avoir un impact tout aussi important : une acidification des océans liée à l'augmentation de la concentration atmosphérique en CO₂ [7], une augmentation de la vitesse des vents, une augmentation de la stabilité des colonnes d'eau

due à une stratification de températures, une modification des circulations des masses d'eau,... Tous ces phénomènes pourraient ainsi modifier l'équilibre entre diatomées et dinoflagellés, tout comme l'écotoxicologie de ces espèces [8], et donc en final impacter la quantité et le type de toxines marines produites [9].

Si la modélisation du lien « changement climatique-émergence de toxines marines » est quasiment impossible à établir du au grand nombre de variables à prendre en compte. Il apparaît cependant clairement que la fréquence des épisodes toxiques et des proliférations d'algues (HAB pour *Harmful Algae Bloom*) est en augmentation [10], avec une apparition fréquente de toxines dans de nouvelles zones géographiques. Ainsi, les ciguatoxines, tétrodotoxines, palytoxines, imines cycliques, ostréocines et ovatoxines qui étaient historiquement rapportées dans des eaux chaudes ont plus récemment causés des incidents dans des zones tempérées.

Il est toutefois également admis par la communauté scientifique que la totalité des cas d'émergence ne peut pas être liée uniquement au réchauffement climatique.

Les activités humaines [11] peuvent aussi être directement rendues responsables de :

- la dissémination d'espèces toxiques par les transports d'eaux et de sédiments de ballast (par exemple sur les côtes écossaises) ;
- la présence de poissons accumulateurs de tétrodotoxines dans la mer Méditerranée suite à l'ouverture du canal de Suez et à l'invasion d'espèces de poissons en provenance de la Mer rouge et de l'Océan Indien ;
- l'augmentation de cas de blooms par eutrophisation de la Mer Noire.

Enfin, l'amélioration des méthodes analytiques permet également d'identifier et de détecter de manière de plus en plus sensible les toxines marines émergentes. Il est donc également possible que les cas détectés ces dernières années soient liés aux avancées analytiques et non au changement climatique. Cette hypothèse a par exemple été évoquée pour expliquer l'émergence des imines cycliques et des azaspiracides.

Challenges pour la Santé Publique

Du point de vue de la santé publique, l'émergence de toxines marines dans les fruits de mer pose de sérieux problèmes.

Ces composés ne sont en effet pas visés par la législation et donc non concernés par les méthodes analytiques utilisées en routine dans le cadre des plans de contrôle. En Europe par exemple, la stratégie analytique est basée sur des méthodes de référence qui ont évoluées au cours des années, passant de méthodes biologiques à des méthodes physico-chimiques (HPLC-UV pour les ASPs, HPLC-fluorescence pour les PSPs et LC-MS/MS pour les toxines lipophiles). Les méthodes de routine permettent donc la détection de toxines connues et reprises dans leur champ d'application, mais non celle de toxines émergentes. Afin de garantir la sécurité alimentaire, il est donc important que les méthodes biologiques soient appliquées périodiquement pour le contrôle des zones de production pour la détection de toxines marines émergentes, comme prévu dans le règlement 2011/15/UE.

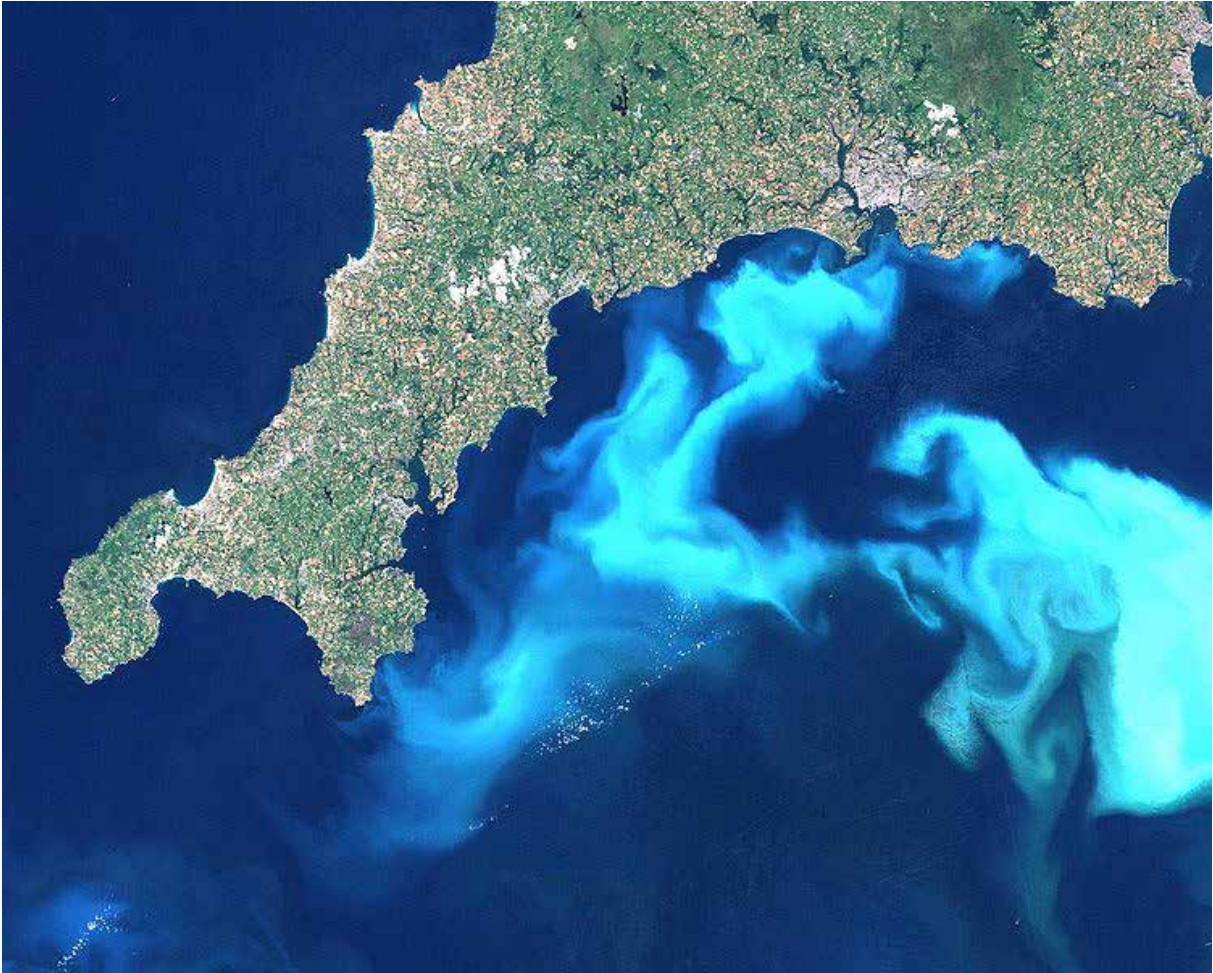
Enfin, les standards analytiques de référence et les données toxicologiques sont fréquemment manquants pour les toxines émergentes. Ces manquements entravent aussi respectivement le développement des méthodes analytiques et la fixation de limites d'action.



Bibliographie:

- [1] Rodriguez, P.; Alfonso, A.; Vale, C.; Alfonso, C.; Vale, P.; Tellez, A.; Botana, L.M. First toxicity report of tetrodotoxin and 5,6,11-trideoxyTTX in the trumpet shell *Charonia lampas lampas* in Europe. *Anal. Chem.* 2008, 80, 5622–5629.
- [2] Vlamis A., Katikou P., Rodriguez I., Rey V., Alfonso A., Papazachariou A., Zacharaki T., Botana A., Botana L. First Detection of Tetrodotoxin in Greek Shellfish by UPLC-MS/MS Potentially Linked to the Presence of the Dinoflagellate *Prorocentrum minimum*. *Toxins.* 2015, 7, 1779-1807.
- [3] Turner, A.D.; Powell, A.; Schofield, A.; Lees, D.N.; Baker-Austin, C. Detection of the pufferfish toxin tetrodotoxin in European bivalves, England, 2013 to 2014. *Euro Surveill.* 2015, 20.
- [4] Kohli, G. S., Murray, S. A., Neilan, B. A., Rhodes, L. L., Harwood, D. T., Smith, K. F., Meyer, L., Capper, A., Brett, S., and Hallegraef, G. M. High abundance of the potentially maitotoxic dinoflagellate *Gambierdiscus carpenteri* in temperate waters of New South Wales, Australia. *Harmful Algae.* 2014, 39, 134–145.
- [5] Kohli, G. S., Farrell, H., and Murray, S. A. *Gambierdiscus*, the cause of ciguatera fish poisoning: an increased human health threat influenced by climate change, in *Climate Change and Marine and Freshwater Toxins* (Botana, L. M., Louzao, M. C., and Vilariño, N., Eds.) 2015, pp 273–312, De Gruyter, Berlin.
- [6] Stivala C.E., Benoit E., Araoz R., Servent D., Novikov A., Molgo J., Zakarian A. Synthesis and biology of cyclic imine toxins, an emerging class of potent, globally distributed marine toxins. *Nat Prod Rep.* 2015, 32(3), 411-435.
- [7] Nikinmaa, M., and Anttila, K. (2015) Responses of marine animals to ocean acidification, in *Climate Change and Marine and Freshwater Toxins* (Botana, L. M., Louzao, M. C., and Vilariño, N., Eds.) pp 99–123, De Gruyter, Berlin. [8] Murray, S., John, U., and Kremp, A. *Alexandrium* spp.: genetic and ecological factors influencing saxitoxin production and proliferation, in *Climate Change and Marine and Freshwater Toxins* (Botana, L. M., Louzao, M. C., and Vilariño, N., Eds.) 2015, pp 125–154, De Gruyter, Berlin.
- [9] Otero, P., Alfonso, A., Vieytes, M. R., Cabado, A. G., Vieites, J. M., and Botana, L. M. Effects of environmental regimens on the toxin profile of *Alexandrium ostenfeldii*. *Environ. Toxicol. Chem.* 2010, 29, 301–310.
- [10] Hallegraef, G. M. Harmful marine algal blooms and climate change: progress on a formidable predictive challenge, in *Climate Change and Marine and Freshwater Toxins* (Botana, L. M., Louzao, M. C., and Vilariño, N., Eds.) 2015, pp 181–193, De Gruyter, Berlin.
- [11] Botana L.M Toxicological perspective on climate change : aquatic toxins. *Chemical Research in Toxicology.* 2016, 29, 619-625

info@cergrupe.be



https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cwall99_lg.jpg



Analyse des allergènes alimentaires : état de l'art et perspectives pour le contrôle des aliments

Mélanie Planque¹, Marjolein Vandekerckhove², Isabel Taverniers² et Nathalie Gillard¹

¹CER Groupe - Département Santé, Rue du Point du Jour 8, 6900 Marloie

²ILVO, unité Technologie & Alimentation, Burg. Van Gansberghelaan 115, 9820 Merelbeke

L'allergie alimentaire est définie comme une réponse immunologique indésirable à un aliment particulier. Les réactions et la gravité des symptômes varient d'un patient à l'autre, mais celles-ci peuvent entraîner des chocs anaphylactiques [1]. Le taux d'allergie alimentaire est en constante augmentation, les estimations actuelles montrent que près de 5 % des adultes et au moins 8 % des enfants souffrent d'allergies alimentaires [2]. Bien que de nombreuses études cliniques aient été menées, la seule stratégie de prévention d'allergie consiste à éliminer l'ingrédient de son régime alimentaire. Pour aider les consommateurs allergiques, la directive européenne CE/1169/2011 exige l'étiquetage des 14 allergènes majoritaires sur les produits alimentaires lorsque ceux-ci sont utilisés comme ingrédients ou produits dérivés [3,4]. Toutefois, les produits alimentaires peuvent être contaminés avec des allergènes lors des processus de fabrication pouvant provoquer des réactions allergiques sévères [5]. Pour protéger les consommateurs allergiques, les industries alimentaires utilisent un étiquetage de précaution des allergènes (PAL ou *Precautionary Allergen Labelling*), tel que « peut contenir... ». Cependant, le manque de relation entre l'étiquetage PAL et l'évaluation des risques d'allergie engendre un étiquetage peu fiable et restreint parfois inutilement le régime alimentaire des consommateurs [6].

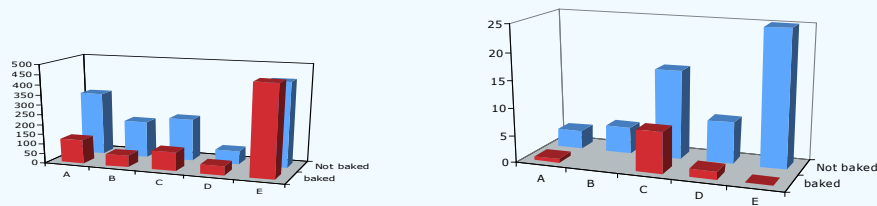
Afin de protéger les consommateurs allergiques et d'éviter les rappels alimentaires coûteux, l'utilisation de méthodes fiables pour la détection des allergènes est d'une importance capitale. Néanmoins, les laboratoires de contrôle doivent encore faire face aux difficultés décrites dans cet article.

1/ Méthodes disponibles pour la détection des allergènes alimentaires

Les méthodes les plus utilisées sont de type immunoessai et sont basées sur la reconnaissance des protéines allergènes par des anticorps comme les tests de type « tiges » (industries alimentaires) et les tests ELISA (« *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* », laboratoires de routine). Cependant, la modification des protéines lors des processus de fabrication industriels ou la présence de composés interférents (polyphénols, matières grasses...) peut compromettre la liaison avec les anticorps. Ces phénomènes peuvent conduire à une sous-estimation de la teneur en allergènes ou encore à des faux négatifs, comme le montre la figure 1 [7-10] ; à contrario, la liaison des anticorps peut se diriger contre d'autres protéines apparentées/homologues pouvant conduire à des résultats faux positifs, phénomène appelé aussi réactivité croisée.

Figure 1 : Analyse de cookies crus et cuits et contenant 1000 mg/kg de lait en poudre (Institut National des Standards et de la technologie SRM 1549a) avec différents kits ELISA pour la détection de (A) la caséine (B) β -lactoglobuline [7]

[axe x: kits ELISA; axe Y: concentration estimée (unité du kit)]



Les méthodes basées sur l'ADN, comme la méthode de réaction de polymérisation en chaîne en temps réel (RT PCR), sont également utilisées pour détecter la présence de composés allergènes. Cette technique prouve la présence de l'ingrédient, mais la présence d'un fragment d'ADN spécifique à l'ingrédient ne prouve pas la présence de la protéine allergénique. Parfois, cela peut conduire à des résultats faux-positifs (ex. confusion entre l'ADN du poulet et de l'œuf) [11]. Cependant, cette réactivité croisée peut-être également observée pour les tests ELISA, où, par exemple certains kits de détection de la moutarde détecteront également le colza [12].

Le besoin de méthodes d'analyse fiables pour la détection des allergènes alimentaires a incité les chercheurs à développer des méthodes complémentaires comme celles basées sur la spectrométrie de masse [13]. La chromatographie liquide ultra-haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem (UHPLC-MS/MS) est basée sur l'analyse de peptides après une digestion enzymatique des protéines [14]. Malgré le coût d'investissement élevé et le besoin de personnel qualifié, les méthodes UHPLC-MS/MS ont pour avantages de cibler plusieurs allergènes en une seule analyse (Fig. 2) et d'être hautement spécifiques et sensibles, même lors de l'analyse de produits alimentaires transformés.



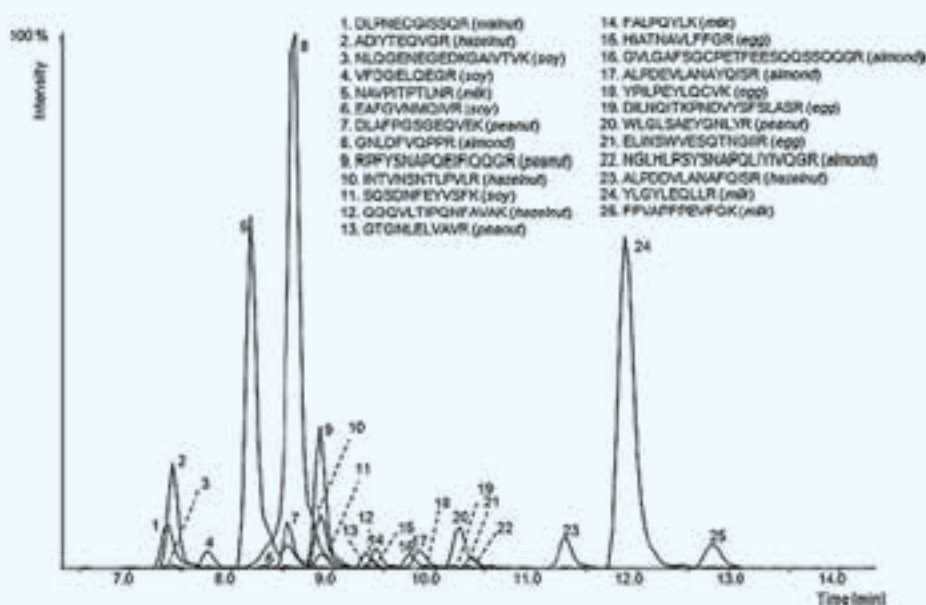


Figure 2 : Chromatogramme MRM (Multiple Reaction Monitoring) obtenu lors de l'analyse de sept allergènes dans un matériel de référence, le pain cuit, à une teneur de 1000 mg/kg en allergène [15].

2/ Les allergènes alimentaires : les défis restants

Même si les industries et les autorités alimentaires ont actuellement accès à plusieurs techniques pour la détection des allergènes alimentaires, les laboratoires doivent toujours faire face à certains défis.

2.1 Le manque de seuil réglementaire

Pour faire face à l'absence de limites d'action légales, l'initiative VITAL (« *Voluntary Incidental Trace of Allergen Labelling* ») a été développée en Australie et en Nouvelle-Zélande afin d'aider les producteurs dans la gestion des contaminations dans les chaînes de production. VITAL a fixé des seuils sur base de données d'études cliniques pour les allergènes crus et cuits sans les différencier [16,17]. Malheureusement, bien que les autorités de sécurité alimentaire de nombreux pays y font souvent référence lors d'évaluation de risques, ce système n'a actuellement aucune valeur réglementaire.

2.2 Absence d'harmonisation des méthodes

2.2.1 Différence entre les unités de reportage

Des méthodes basées sur l'analyse d'ADN, de protéines ou encore de peptides ont été développées pour la détection des allergènes alimentaires et tant les industries que les laboratoires et les autorités alimentaires doivent faire un choix entre ces approches ou une combinaison de celles-ci. L'absence de standards de référence communs, ainsi que des différences d'unités de reportage, rendent la comparaison des résultats difficile, même lorsqu'il s'agit d'un même type de méthode comme le montre le tableau 1.

Tableau 1 : Comparaison des standards, unités et sensibilité de kits ELISA.

Fournisseur	Format	Standard	Seuil de sensibilité / LOQ (mg/kg)	Gamme de concentration
Kit 1	Sandwich	Caséine	0,5	0,5 -20
Kit 2	Sandwich	Poudre de lait (écrémé)	1,0	1,0 – 10,0
Kit 3	Compétitif	Poudre de lait		
NIST SRM 8435 (exprimé en caséine)	1,6	1,6 – 25		
Kit 4	Sandwich	Protéine de lait	0,312	0,312 – 20

Une stratégie commune devrait être adoptée pour faciliter la comparaison des résultats obtenus avec des tests différents ; celle-ci pourrait inclure des facteurs de conversion et/ou mieux encore l'utilisation de standards de référence communs.



2.2.2 Détermination de la sensibilité de la méthode

La détermination de la sensibilité des méthodes d'analyse est évaluée par différentes approches : par ajout de protéines extraites [21,22] (dans un tampon ou dans des produits alimentaires) ou par contamination des produits alimentaires avant ou après cuisson [18, 20, 23].

La sensibilité du test ELISA est ainsi souvent estimée en dopant des protéines extraites dans des aliments. Pour garantir l'efficacité des méthodes de détection, de plus en plus de méthodes UHPLC-MS/MS évaluent quant à elles leur sensibilité en utilisant des aliments ayant été contaminés par des ingrédients allergènes avant cuisson (tableau 2 [15,18-20]). Cette stratégie permet une estimation plus réaliste de la sensibilité de la méthode en ce qui concerne l'analyse de produits réels.

Tableau 2 : Sensibilité de différentes méthodes de détection des allergènes par UHPLC-MS/MS dans les produits alimentaires cuits par rapport aux seuils VITAL pour une portion ingérée de 40 g d'aliment.

	Lait	Oeuf	Arachide	Soja	Expression des résultats
VITAL	2,5	0,7	5	25	mg de protéines totales par kg
Heick <i>et al.</i> [15]	10	50	10	50	mg de protéines solubles par kg
Gomaa <i>et al.</i> [18]	10	-	-	10	mg de protéine totale par kg
Monaci <i>et al.</i> [19]	26	30	30	18	mg d'ingrédient par kg
Planque <i>et al.</i> [20]	0.5	3,4	2,5	5	mg de protéine totale par kg

Ces différentes stratégies peuvent mener à de grandes différences dans l'estimation de la sensibilité d'une méthode (limite de quantification ou LOQ). Un exemple de la variabilité de la LOQ observée en utilisant ces différentes approches est présenté à la figure 3.

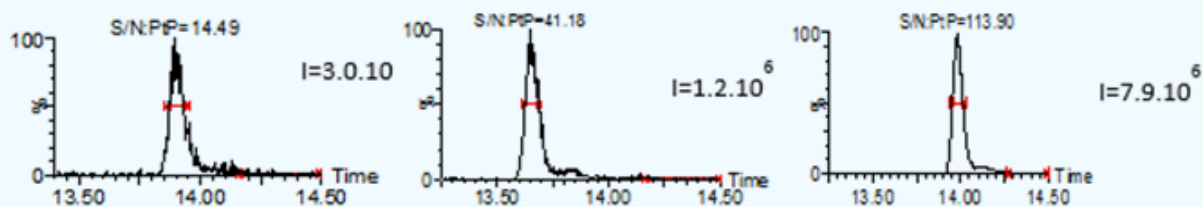


Figure 3 : Chromatogrammes obtenus lors de l'analyse de la caséine $\alpha 1$ du lait pour le peptide FFVAPFPEVFGK (692,7> 920,5) dans des échantillons contenant 0,5 mg de protéines de lait par kg (A) biscuits cuits au four (180 °C - 36 min), seuil de sensibilité théorique : (rapport signal sur bruit égal à 10 ($S/N = 10$)) 0,5 mg/kg (B) l'addition d'extrait de protéines dans du biscuit seuil de sensibilité théorique : 0,125 mg/kg, et (C) l'addition d'extrait de protéine dans du solvant seuil de sensibilité théorique : 0,05 mg/kg. Du lait en poudre : NIST 1549a (25,6 % de protéines) a été utilisé pour effectuer cette expérience en suivant le protocole de Planque et al. 2016 [20].

La différence entre ces chromatogrammes a prouvé la nécessité de suivre une ligne directrice commune pour la détermination de la performance des méthodes de détection des allergènes (tel que décrit dans [24]), de plus, des standards et des matériaux de référence sont nécessaires pour arriver à une harmonisation des méthodes.

2.3 Champ d'application des méthodes d'analyse

Les laboratoires de routine doivent également faire face à un autre défi : la grande variété de produits alimentaires reçus pour l'analyse des allergènes. Les méthodes ne peuvent pas être validées pour la totalité des aliments. Cependant, les laboratoires doivent pouvoir garantir la justesse et la précision des résultats pour tous les échantillons, même en cas d'interférences ou de denrées transformées. Le champ d'application d'une méthode analytique doit donc être clairement défini. Les laboratoires doivent également élaborer une stratégie pour valider quantitativement leur méthode, en particulier pour les produits alimentaires transformés.

3 /Conclusion

Les consommateurs recherchent des produits alimentaires sûrs. Les producteurs alimentaires sont donc poussés à une évolution constante, ce qui conduira au remplacement de l'étiquetage de précaution abusif des allergènes par une évaluation et une gestion des risques.

Une réelle amélioration a été faite pour la détection des allergènes dans les produits alimentaires cuits avec des méthodes UHPLC-MS /MS, avec une sensibilité proche ou inférieure au niveau de seuil fixé par le système VITAL. Il reste cependant un long chemin à faire pour atteindre l'harmonisation des méthodes d'analyse.

Références:

- [1] S. Wasserman, W. Watson, Food allergy, *Allergy, Asthma Clin. Immunol.* 7 (2011) S7. doi:10.1186/1710-1492-7-S1-S7.
- [2] S.H. Sicherer, H.A. Sampson, Food allergy: Epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment., *J. Allergy Clin. Immunol.* 133 (2014) 291–307; quiz 308. doi:10.1016/j.jaci.2013.11.020.
- [3] S.M. Gendel, Comparison of international food allergen labeling regulations, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 63 (2012) 279–285. doi:10.1016/j.yrtph.2012.04.007.
- [4] Regulation (EU) No 1169/2011 of the European Parliament and of the Council of 25 October 2011 on the provision of food information to consumers, amending Regulations (EC) No 1924/2006 and (EC) No 1925/2006 of the European Parliament and of the Council, and repealing Commission Directive 87/250/EEC, Council Directive 90/496/EEC, Commission Directive 1999/10/EC, Directive 2000/13/EC of the European Parliament and of the Council, Commission Directives 2002/67/EC and 2008/5/EC and Commission Regulation (EC) No 608/2004 Text with EEA relevance *OJ L 304, 22.11.2011, p. 18–63 (BG, ES, CS, DA, DE, ET, EL, EN, FR, IT, LV, LT, HU, MT, NL, PL, PT, RO, SK, SL, FI, SV) Special edition in Croatian: Chapter 15 Volume 020 P. 168 - 213.*
- [5] M.Q.I. Spanjersberg, A.C. Knulst, A.G. Kruizinga, G. Van Duijn, G.F. Houben, Concentrations of undeclared allergens in food products can reach levels that are relevant for public health, *Food Addit. Contam. Part A.* 27 (2010) 169–174. doi:10.1080/19440040903317513.
- [6] K.J. Allen, P.J. Turner, R. Pawankar, S. Taylor, S. Sicherer, G. Lack, N. Rosario, M. Ebisawa, G. Wong, E.N.C. Mills, K. Beyer, A. Fiocchi, H.A. Sampson, Precautionary labelling of foods for allergen content: are we ready for a global framework?, *World Allergy Organ. J.* 7 (2014) 10. doi:10.1186/1939-4551-7-10.
- [7] V. Dumont, S. Kerbach, R. Poms, P. Johnson, C. Mills, B. Popping, S. Tömösközi, P. Delahaut, Development of milk and egg incurred reference materials for the validation of food allergen detection methods, *Qual. Assur. Saf. Crop. Foods.* 2 (2010) 208–215. doi:10.1111/j.1757-837X.2010.00081.x.
- [8] A. Iqbal, F. Shah, M. Hamayun, A. Ahmad, A. Hussain, M. Waqas, S.-M. Kang, I.-J. Lee, Allergens of *Arachis hypogaea* and the effect of processing on their detection by ELISA., *Food Nutr. Res.* 60 (2016) 28945. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4773821&tool=pmcentrez&render-type=abstract> (accessed April 26, 2016).
- [9] S. Khuda, A. Slate, M. Pereira, F. Al-Taher, L. Jackson, C. Diaz-Amigo, E.C. Bigley, T. Whitaker, K.M. Williams, Effect of processing on recovery and variability associated with immunochemical analytical methods for multiple allergens in a single matrix: sugar cookies., *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) 4195–203. doi:10.1021/jf3001839.
- [10] L. Monaci, M. Brohé, V. Tregoat, A. van Hengel, Influence of baking time and matrix effects on the detection of milk allergens in cookie model food system by ELISA., *Food Chem.* 127 (2011) 669–75. doi:10.1016/j.foodchem.2010.12.113.
- [11] S.M. Albillos, Detection Problems Associated to Processed Food Allergens, *J. Food Process. Technol.* 03 (2012) 1–2. doi:10.4172/2157-7110.1000e104.
- [12] I. Taverniers, B. Van Droogenbroeck, M. De Loose. Soort-specifieke PCR detectie van mosterd species (*Sinapis alba*, *Brassica nigra*, *Brassica juncea*) als potentiële “verborgen” allergenen in voeding. *LabInfo* 12, 2014-07, p.23-28
- [13] L. Monaci, A. Visconti, Mass spectrometry-based proteomics methods for analysis of food allergens, *Trends Anal. Chem.* 28 (n.d.) 581–591. doi:10.1016/j.trac.2009.02.013.
- [14] N. Gillard, O. Gaëtan, P. Delahaut, Analyse d’allergènes alimentaires par LC-MS/MS, *LabInfo* (2015.) p21-28.

- [15] J. Heick, M. Fischer, B. Pöpping, First screening method for the simultaneous detection of seven allergens by liquid chromatography mass spectrometry., *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 938–43. doi:10.1016/j.chroma.2010.12.067.
- [16] K.J. Allen, B.C. Remington, J.L. Baumert, R.W. R Crevel, G.F. Houben, S. Brooke-Taylor, A.G. Kruizinga, S.L. Taylor, Allergen reference doses for precautionary labeling (VITAL 2.0): Clinical implications, *J. Allergy Clin. Immunol.* 133 (2014) 156–164. doi:10.1016/j.jaci.2013.06.042.
- [17] S.L. Taylor, J.L. Baumert, A.G. Kruizinga, B.C. Remington, R.W.R. Crevel, S. Brooke-Taylor, K.J. Allen, N. Zealand, G. Houben, Establishment of Reference Doses for residues of allergenic foods: Report of the VITAL Expert Panel, *FOOD Chem. Toxicol.* 63 (2014) 9–17. doi:10.1016/j.fct.2013.10.032.
- [18] A. Gomaa, J. Boye, Simultaneous detection of multi-allergens in an incurred food matrix using ELISA, multiplex flow cytometry and liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS), *Food Chem.* 175 (2015) 585–92. doi:10.1016/j.foodchem.2014.12.017.
- [19] L. Monaci, R. Pilolli, E. De Angelis, R. Carone, M. Pascale, LC-tandem mass spectrometry as a screening tool for multiple detection of allergenic ingredients in complex foods, *ACTA IMEKO.* 5 (2016) 5–9. [https://acta.imeko.org/index.php/acta-imeko/article/view/IMEKO-ACTA-05 %282016%29-03](https://acta.imeko.org/index.php/acta-imeko/article/view/IMEKO-ACTA-05%282016%29-03) (accessed May 27, 2016).
- [20] M. Planque, T. Arnould, M. Dieu, P. Delahaut, P. Renard, N. Gillard, Advances in ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry for sensitive detection of several food allergens in complex and processed foodstuffs., *J. Chromatogr. A.* 1464 (2016) 115–23. doi:10.1016/j.chroma.2016.08.033.
- [21] R. Korte, S. Lepski, J. Brockmeyer, Comprehensive peptide marker identification for the detection of multiple nut allergens using a non-targeted LC-HRMS multi-method., *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 3059–69. doi:10.1007/s00216-016-9384-4.
- [22] L. Monaci, R. Pilolli, E. De Angelis, M. Godula, A. Visconti, Multi-allergen detection in food by micro high-performance liquid chromatography coupled to a dual cell linear ion trap mass spectrometry., *J. Chromatogr. A.* 1358 (2014) 136–44. doi:10.1016/j.chroma.2014.06.092.
- [23] J. Heick, M. Fischer, S. Kerbach, U. Tamm, B. Popping, Application of a liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the simultaneous detection of seven allergenic foods in flour and bread and comparison of the method with commercially available ELISA test kits., *J. AOAC Int.* 94 1060–8. <http://europepmc.org/abstract/med/21919338> (accessed April 28, 2016).
- [24] V. Paez, W.B. Barrett, X. Deng, C. Diaz-Amigo, K. Fiedler, C. Fuerer, G.L. Hostetler, P. Johnson, G. Joseph, E.J.M. Konings, M. Lacorn, J. Lawry, H. Liu, E. Marceau, K. Mastovska, L. Monteroso, S.-J. Pan, C. Parker, M.M. Phillips, B. Popping, S. Radcliffe, C.A. Rimmer, M. Roder, A. Schreiber, J. Sealey-Voyksner, J. Shippar, D.P. Siantar, D.M. Sullivan, J. Sundgaard, J. Szpylka, J. Turner, B. Wirthwine, J.L. Wubben, S. Yadlapalli, J. Yang, J.M. Yeung, J. Zweigenbaum, S.G. Coates, Standard Method Performance Requirements (SM-PRs®) for Detection and Quantitation of Selected Food Allergens, *J. AOAC Int.* 99 (2016) 1122–1124. doi:10.5740/jaoacint.SMPR2016.002.

m.planque@cergroupe.be ; infolnr@cergroupe.be



Analyse des pignons de pin responsables du PNS (syndrome du pignon de pin)

Jeroen Vancutsem¹, Koen Doms² et Hans Rediers²

¹ AFSCA, FLVVT, Leuvensesteenweg 17, 3080 Tervuren

² Laboratorium voor Microbiële Procesecologie en -beheersing, KU Leuven – campus De Nayer

Introduction

L'intérêt pour les pignons de pin est de plus en plus marqué au niveau mondial. Cela a des répercussions à différents niveaux. Dans le sud-est de la Sibérie, *Pinus koraiensis* est un facteur économique important ; les récoltes intensives pouvant dès lors provoquer localement des dégâts à l'environnement. De plus, les prix des pignons de pin ont fortement augmenté en raison de la consommation élevée de ces dernières années et du caractère cyclique de la production [de 2 à 7 ans (production voir figure 1)]. En 2009, après une mauvaise récolte, le prix a même augmenté de 10€/kg à 40€/kg. De ce fait, des espèces de pignons de pin non comestibles ont également fait leur apparition sur le marché international, comme les pignons de pin de *P. armandii*, qui se retrouvent surtout en Chine (propagation voir figure 2).

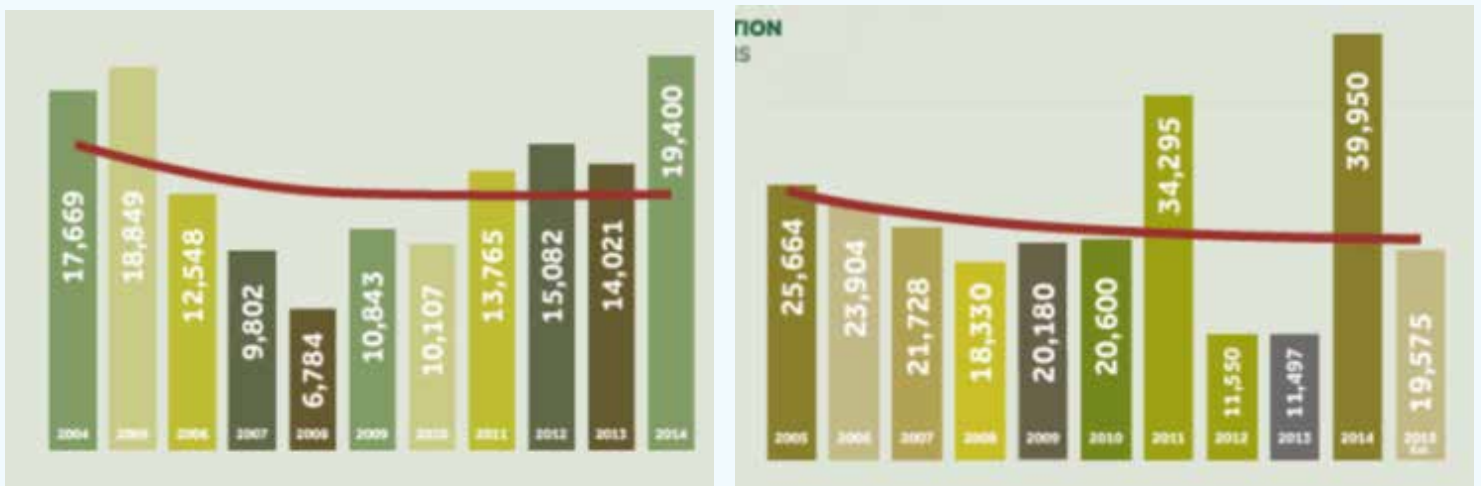


Figure 1 : Production de pignons de pin (gauche) et exportation (droite)

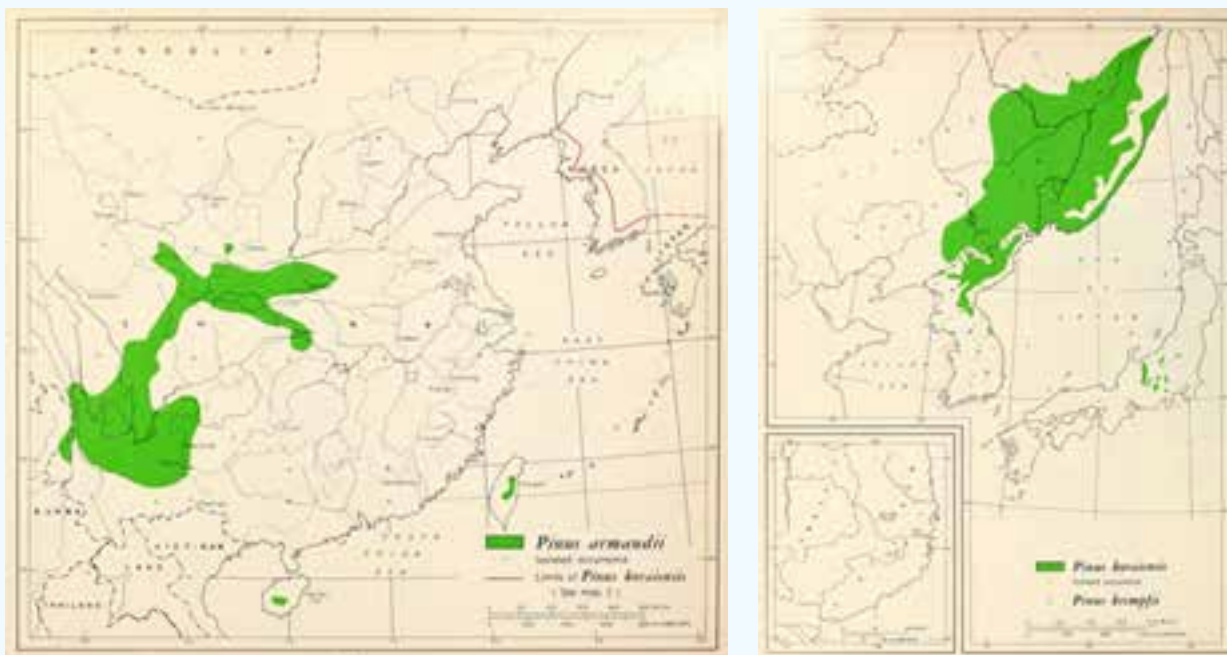


Figure 2 : Répartition du *P. armandii* (à gauche) et du *P.koraiensis* (à droite)

Syndrome du pignon de pin (PNS)

L'ingestion de pignons de pin du *P. armandii* est responsable du syndrome du pignon de pin (PNS). Un à deux jours après l'ingestion de pignons de pin, un arrière-goût amer peut apparaître en bouche et persister généralement quelques jours voire parfois quelques semaines. Mais la cause de ce syndrome du pignon de pin n'a pas encore pu être décelée. Une hypothèse intéressante avance que ces pignons de pin, par rapport à d'autres espèces de *Pinus*, comme le *P. pinea*, contiennent beaucoup d'acide pinolénique (voir figure 3) qui stimule le système entéro-endocrinien pour sécréter de la cholécystokinine (CCK).

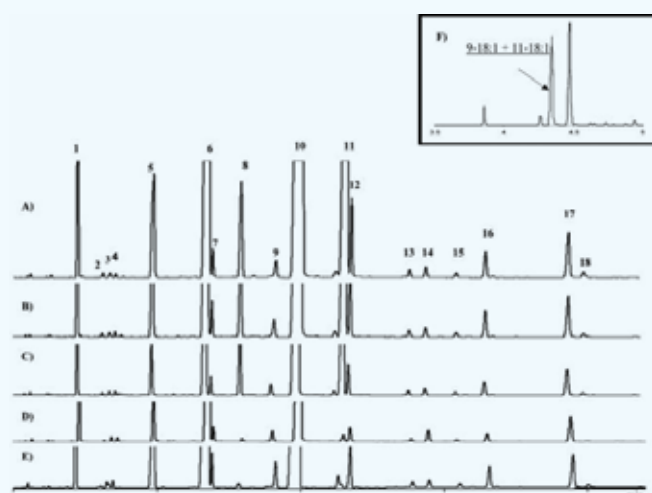


Figure 3 : Chromatogrammes typiques des esters méthyliques d'acide gras de (A) *P. koraiensis* ; (B) *<170P. armandii* ; (C) *P. sibirica* ; (D) *P. gerardiana* ; (E) *P. pinea* en GC-FID avec (11) = acide pinoléniq (source : Fardin-kia et al., 2012)

La cholécystokinine (CCK) entraîne, entre autres, une production accrue de bile par le foie et veille à ce que cette bile soit libérée dans le tractus gastro-intestinal. L'excès de bile peut créer une « interconnexion » dans le cerveau entre les récepteurs du goût amer sur la langue et ceux du tractus gastro-intestinal avec, pour conséquence, un arrière-goût amer. Cette hypothèse donne également une explication possible quant à la persistance de ces symptômes puisque, par recirculation entérohépatique, certains métabolites du foie, excrétés par les voies biliaires, sont réabsorbés dans le duodénum.

La FAO a publié une liste des espèces de pignons de pin comestibles (voir tableau 1). Les espèces de pignons de pin qui ne sont pas reprises dans ce tableau ne sont pas considérées comme comestibles.

Tableau 1 : Tableau des espèces de pignons de pin comestibles. Le sigle « * » représente les espèces ayant la valeur économique la plus importante (FAO, 1998 ; Zonneveld, 2008)

<i>P. ayacahuite</i>	Mexique, Amérique centrale
<i>P. albicaulis</i>	Ouest du Canada et États-Unis
<i>P. cembra</i>	Europe (Alpes et Carpates)
<i>P. flexilis</i>	Ouest du Canada et États-Unis
<i>P. gerardiana</i> *	Est de l'Afghanistan, Pakistan, Nord de l'Inde
<i>P. koraiensis</i> *	Est de la Chine, Japon, Corée, Sud-est de la Sibérie
<i>P. lambertiana</i>	Ouest des États-Unis (Californie, Oregon)
<i>P. monticola</i>	Nord-ouest des États-Unis et partie correspondante du Canada
<i>Piñon pines</i> *	Nord du Mexique, Sud-ouest des États-Unis
<i>P. pumila</i>	Est de la Sibérie, Ouest de la Chine, Corée, Nord du Japon
<i>P. sibirica</i> *	Russie (Sibérie centrale), Mongolie
<i>P. strobiliformis</i>	Nord du Mexique, Sud-ouest des États-Unis
<i>P. coulteri</i>	États-Unis (Californie)
<i>P. pinea</i> *	Europe méditerranéenne et Proche-Orient
<i>P. ponderosa</i>	Ouest du Canada et États-Unis
<i>P. sabiniana</i>	États-Unis (Californie)
<i>P. roxburghii</i>	Inde
<i>P. torreyana</i>	États-Unis (Californie)

Méthodes d'analyse

Méthode visuelle

En 2010, une méthode d'analyse visuelle a été développée par le FLVVT. Sur la base d'échantillons de référence (voir figure 4) obtenus par le centre antipoison et un opérateur, une méthode d'identification a été mise au point à l'aide des caractéristiques visuelles. Les pignons de pin des différentes espèces peuvent se distinguer entre eux sur base de leur grandeur et de leur forme. Les paramètres qui contribuent à l'identification sont le nombre de pignons de pin par 100 g et son corollaire, le tamisat passant par un tamis aux mailles de 4 mm.



Figure 4 : Pignons de pin (A) *P. pinea*, (B) *P. armandii*, (C) *P. gerardiana*, (D) *P. koraiensis*, (E) *P. sibirica*, (F) *P. massoniana*, (G) *P. yunnanensis*, (H) *P. pumila* (les photos ne sont pas à l'échelle)



GC-FID

De 2011 à 2013, des analyses de confirmation par GC-FID ont été effectuées par le LFSAGx selon la méthode mise au point par Destailats *et al.* (2010). Les pignons de pin ont été identifiés sur la base du profilage des acides gras des différentes espèces, à savoir l'indice de diagnostic (ID).

L'ID est défini comme :
$$DI = \frac{c + (5,9 - 18 : 2 + 5,9,12 - 18 : 3 + 5,11,14 - 20 : 3)}{(18 : 1 n - 9 \text{ en } n - 7) + 18 : 2 n - 6 + 20 : 2 n - 6} \times 10$$

avec les valeurs des acides gras individuels exprimés en % de la teneur totale en acides gras.

Sur la base de la publication de Wolff *et al.* (2000), un ID de référence a pu être déterminé pour les différentes espèces de pignons de pin (voir tableau 2).

Tableau 2 : Valeur ID pour les différentes espèces de pignons de pin (Wolff *et al.*, 2000)

Espèces	<i>P. gerardiana</i>	<i>P. pinea</i>	<i>P. koraiensis</i>	<i>P. armandii</i>	<i>P. sibirica</i>	<i>P. massoniana</i>	<i>P. tabuliformis</i>	<i>P. yunannensis</i>
DI	0,17	0,34	2,50	2,92	3,03	3,55	3,82	4,30

Cette méthode peut être utilisée si l'échantillon n'est pas composé d'un mélange de différentes espèces de pignons de pin, sans quoi un signal intermédiaire est obtenu. En présence d'un mélange, une séparation manuelle des pignons est nécessaire.

RT-PCR

Étant donné qu'une séparation visuelle n'est pas toujours très simple puisque certaines espèces se ressemblent et que tous les pignons de pin ne sont pas identiques, une nouvelle méthode a été mise au point en 2013-2014 au sein du FLVVT dans le cadre d'une thèse de maîtrise de la KULeuven. Dans ce contexte, une méthode RT-PCR récemment publiée a été mise en pratique avec quelques modifications : Handy *et al.* (2013) ont choisi des régions intéressantes du génome plastidique où il a été procédé à la recherche de polymorphismes mononucléotidiques simples (SNP) qui sont spécifiques à *P. armandii*. Trois régions candidates ont été choisies et testées. Des primers ont été conçus pour détecter ces SNP avec une longueur d'amplicon de +/- 150 bp. Au cours de l'essai principal, les primers ont encore été optimisés. L'ADN a été extrait avec le kit DNeasy Blood and Tissue (FLVVT : système de purification magnétique de l'ADN Wizard® pour l'industrie alimentaire). Par ailleurs, des sondes LNA (acides nucléiques bloqués) ont été utilisées. Il s'agit de sondes avec des acides aminés modifiés dont la ribosylation est assurée par un pont méthylène entre l'atome O-2' et l'atome C-4' (voir figure 5). Grâce à cette fixation des molécules, ils restent dans la conformation idéale pour la liaison Watson-Crick : la liaison est plus rapide et plus stable.

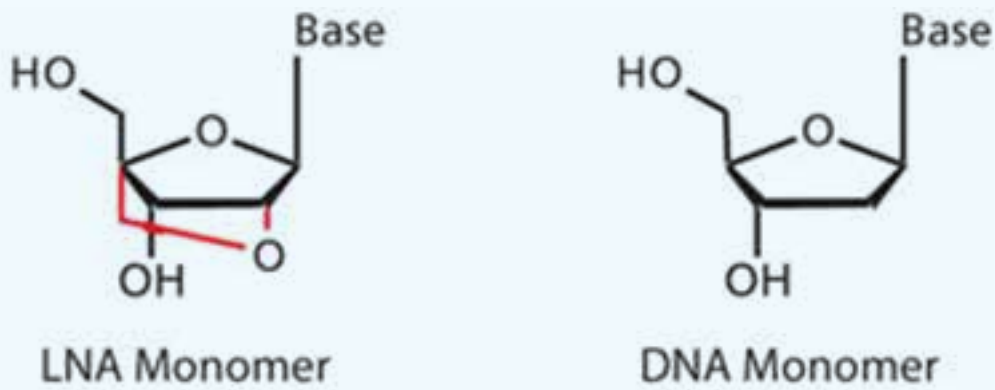


Figure 5 : Monomère LNA et DNA

Parallèlement à la sonde FAM-BHQ1, une sonde de blocage (HEX-BHQ1) a été développée avec une différence d'une seule base, qui est conçue pour se lier à une espèce génétiquement apparentée dont la principale est *P. koraiensis* (voir figure 6).

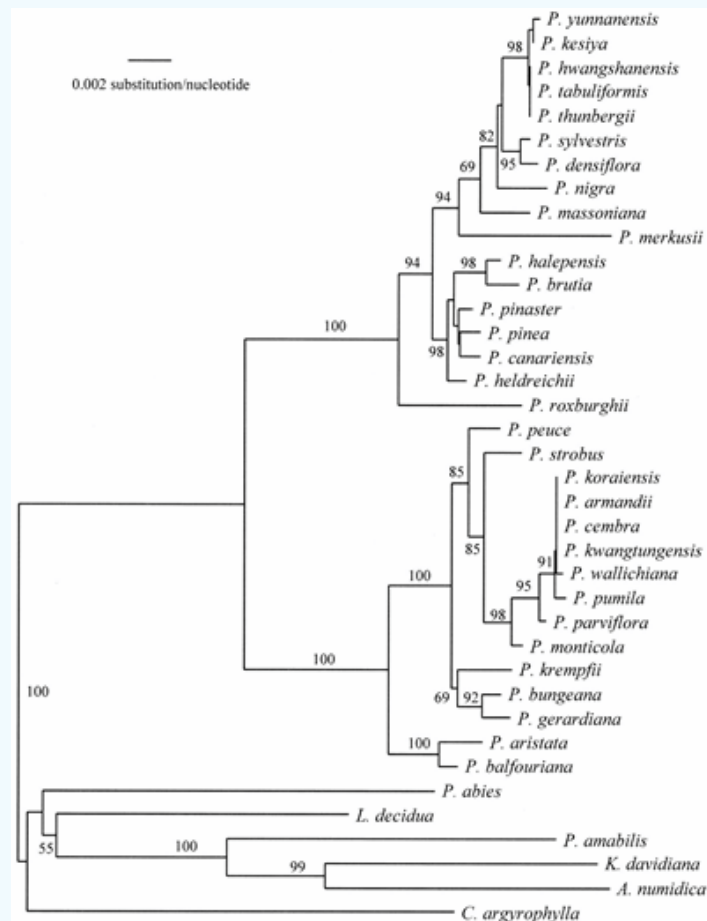


Figure 6 : Parenté phylogénétique entre les espèces de *Pinus* eurasiatiques (Wang et al., 1999)



Les rapporteurs HEX et FAM peuvent être observés dans le même run de RT-PCR, et peuvent aussi être utilisés, par exemple, pour indiquer la présence d'autres espèces de pignons de pin (voir figure 7).

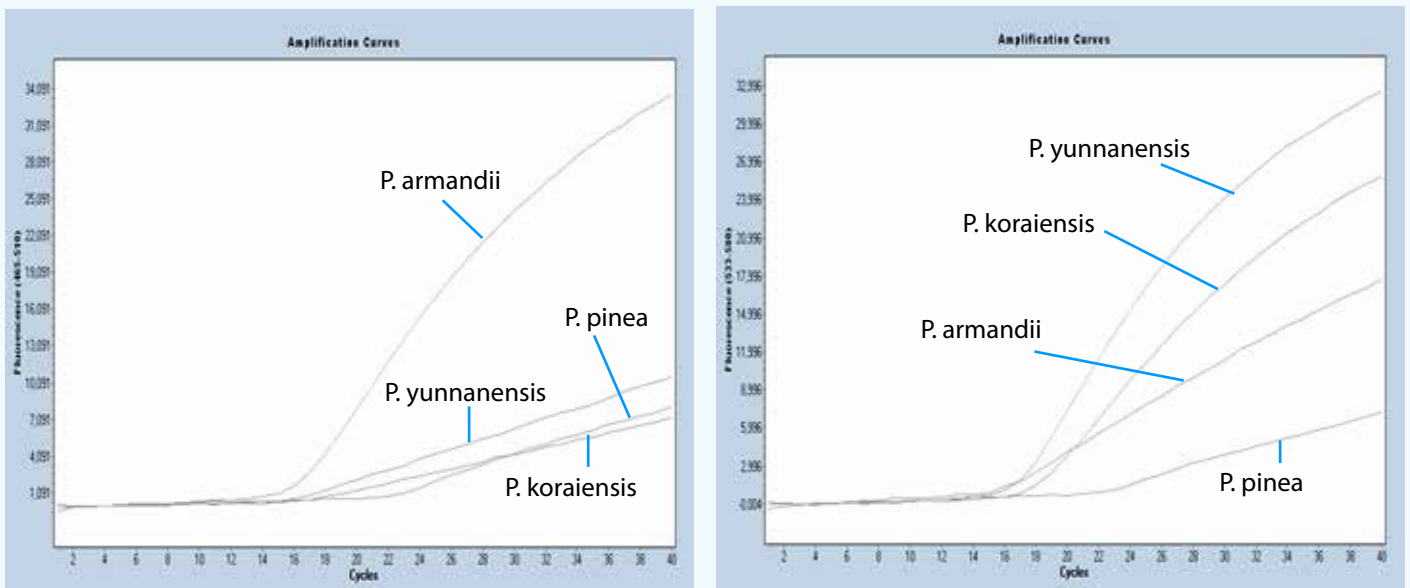


Figure 7 : Courbe d'amplification de quelques espèces de pignons de pin avec le signal FAM (à gauche) et le signal HEX (à droite)

Différentes matrices ont été analysées via ce mode opératoire. À ce jour, aucune réactivité croisée n'a encore été constatée. Une étape suivante est la détection de *P. armandii* dans des mélanges où, selon la littérature, la présence de *P. armandii* peut être démontrée à partir d'une concentration de 1 %.

Publications:

- Destailats, F., Cruz-Hernandez, C., Giuffrida, F., & Dionisi, F. (2010). Identification of the botanical origin of pine nuts found in food products by gas-liquid chromatography analysis of fatty acid profile. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(4): 2082–2087
- Doms, K. (2014). Identificatie van pijnboompitten van *Pinus armandii* door middel van qPCR (71p)
- FAO (1998). Seeds, fruits, and cones. In: *Non-wood forest products from Conifers*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome
- Fardin-kia, A. R., Handy, S. M., & Rader, J. I. (2012). Characterization of Pine Nuts in the U.S. Market, Including Those Associated with “ Pine Mouth ”, by GC-FID. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60: 2701–2711.
- FAVV (2011). Pijnboompitten met bittere nasmaak...? Nieuwsbrief van het federaal voedselagentschap 9e jaargang, Nr 41
- FAVV (2014). <http://www.afsca.be/tips/pijnboompitten.asp>
- Flesch, F. (2010). Pignons de pin et dysgueusie retardée (19p)
- Handy, S. M., Timme, R. E., Jacob, S. M., & Deeds, J. R. (2013). Development of a locked nucleic acid real-time polymerase chain reaction assay for the detection of *Pinus armandii* in mixed species pine nut samples associated with dysgeusia. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(5): 1060–1066.
- INC (2016). Nuts & dried fruits global statistical review 2015/2016.
- Kitsteiner j. (2013). Permaculture Plants: Pine Trees for Pine Nuts. Bron: internet (<http://tcpermaculture.com/site/2013/11/13/permaculture-plants-pine-trees-for-pine-nuts/>), geraadpleegd op 06/01/2017.
- Köbler, H., Monakhova, Y.B., Kuballa, T., Tschiersch, C., Vancutsem, J., Thielert, G., Mohrning, A. and, & Lachenmeier, D. W. (2011). Nuclear magnetic resonance spectroscopy and chemometrics to identify pine nuts that cause taste disturbance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59: 6877–6881.
- Möller, G. (2010). The curious case of the epicurean nut. *Food Technology Magazine* 64(5):1–6
- Pasma, W.J., Heimerikx, J., Rubingh, C.M., van den Berg, R., O’Shea, M., Gambelli, L., H., & H.F.J., Einerhand, A.W.C., Scott, C., Keizer, H.G. and Mennen, L. I. (2008). The effect of Korean pine nut oil on in vitro CCK release, on appetite sensations and on gut hormones in post-menopausal overweight women. *Lipids in Health and Disease*, 7: 10.
- Poeder, S. (2015). Bedreigt onze pestoconsumptie de Siberische tijger? *National Geographic* 29/12/2015
- www.pinenut.com (2010): Why the price of pine nuts increased - the imported ones - and how to save \$10 - \$15 per pound 23/06/2010
- Slaght, J.C. (2015) Making Pesto? Hold the Pine Nuts. *New York Times* 19/10/2015
- Wang, X.R., Tsumura, Y., Yoshimaru, H., Nagasaka, K., Szmidt, A.E (1999). Phylogenetic relationships of Eurasian pines (*Pinus*, Pinaceae) based on chloroplast *rbcl*, *MATK*, *RPL20-RPS18* spacer, and *TRNV* intron sequences. *American Journal of Botany*; 86(12):1742-53.
- Wolff, R. L.; Pédrone, F.; Pasquier, E.; Marpeau, A. M. General characteristics of *Pinus* spp. seed fatty acid compositions, and importance of Δ^5 -olefinic acids in the taxonomy and phylogeny of the genus. *Lipids* 2000, 35, 1–22.
- Zonneveld, B. J. M. (2011). Pine nut syndrome : a simple test for genome size of 12 pine nut – producing trees links the bitter aftertaste to nuts of *P. armandii* Zucc . ex End.I *Plant Systematics and Evolution*. 297: 201–206.

Jeroen.Vancutsem@favv.be



Détection des STEC excrétés par les bovins, au moyen de la Droplet Digital PCR : une détection à l'aide de milliers de gouttelettes

Bavo Verhaegen, Els Van Coillie et Koen De Reu

Instituut voor Landbouw en Visserij Onderzoek – Eenheid Technologie en Voeding, Brusselsesteenweg 370, B-9090 Melle

Introduction

La bactérie intestinale *Escherichia coli* est, en règle générale, une bactérie inoffensive qui fait partie de la flore intestinale saine chez l'homme et les animaux. Toutefois, quelques types d'*E. coli*, tels que les *E. coli* producteurs de Shiga-toxines ou STEC, peuvent provoquer des maladies de niveau modéré à très grave chez l'homme. La capacité de cette bactérie à produire des toxines spécifiques, les Shiga-toxines, peut donner lieu à des diarrhées, des problèmes de coagulation et des insuffisances rénales entraînant parfois la mort, surtout chez les jeunes enfants et les personnes âgées (1). Les ruminants et en particulier les bovins sont considérés comme le principal réservoir de STEC. Alors que ces animaux ne présentent que rarement ou jamais de symptômes, ils se trouvent souvent à l'origine de foyers de STEC chez l'homme, et ce par le biais d'un contact direct avec les animaux ou avec des aliments contaminés par les STEC. Cependant, la manière avec laquelle les STEC arrivent à persister au sein de la population bovine n'est pas encore tout à fait claire. Les animaux infectés peuvent être dépistés en déterminant la présence de STEC dans les fèces. Certains bovins excrètent étonnamment de grands nombres de STEC. Ceux-ci sont appelés des «super excréteurs» et jouent apparemment un rôle crucial dans le maintien d'infections de STEC au sein de la population bovine (2). La détermination des quantités excrétées de STEC présentes dans les fèces peut apporter une plus grande clarté quant à la transmission de STEC, aux sources de contamination et à l'efficacité de certains traitements au niveau de la ferme.

Quantification de STEC

La quantification de STEC a, par le passé, été réalisée sur base d'un étalement direct sur un milieu gélosé avec des séries de dilutions, ce qui prend beaucoup de temps et ne s'avère pas toujours fiable. L'une des principales raisons est que la plupart des milieux d'isolement des STEC ne sont pas suffisamment spécifiques et ne permettent donc pas de faire la distinction entre les *E. coli* commensales et les STEC.

A. PCR quantitative

À l'heure actuelle, afin de déterminer les profils d'excrétion et les sources de contamination de STEC au niveau de la ferme, on utilise de plus en plus de techniques de quantification d'ADN, telles que la PCR quantitative (qPCR), qui est basée sur la quantification des gènes de Shiga-toxines (*stx1* et *stx2*) (3). Avec cette technique, l'augmentation des fragments d'ADN spécifiques est en permanence suivie grâce à l'ajout d'un colorant fluorescent (Figure 1). Pour la quantification, une série de dilutions de référence, dont la quantité exacte de copies est connue, est requise. Sur base de cette série de référence, la quantité initiale de fragments d'ADN peut être déterminée dans l'échantillon inconnu. L'un des inconvénients de cette technique est la nécessité de créer et d'analyser parallèlement une série de référence fiable et spécifique à chaque gène recherché.

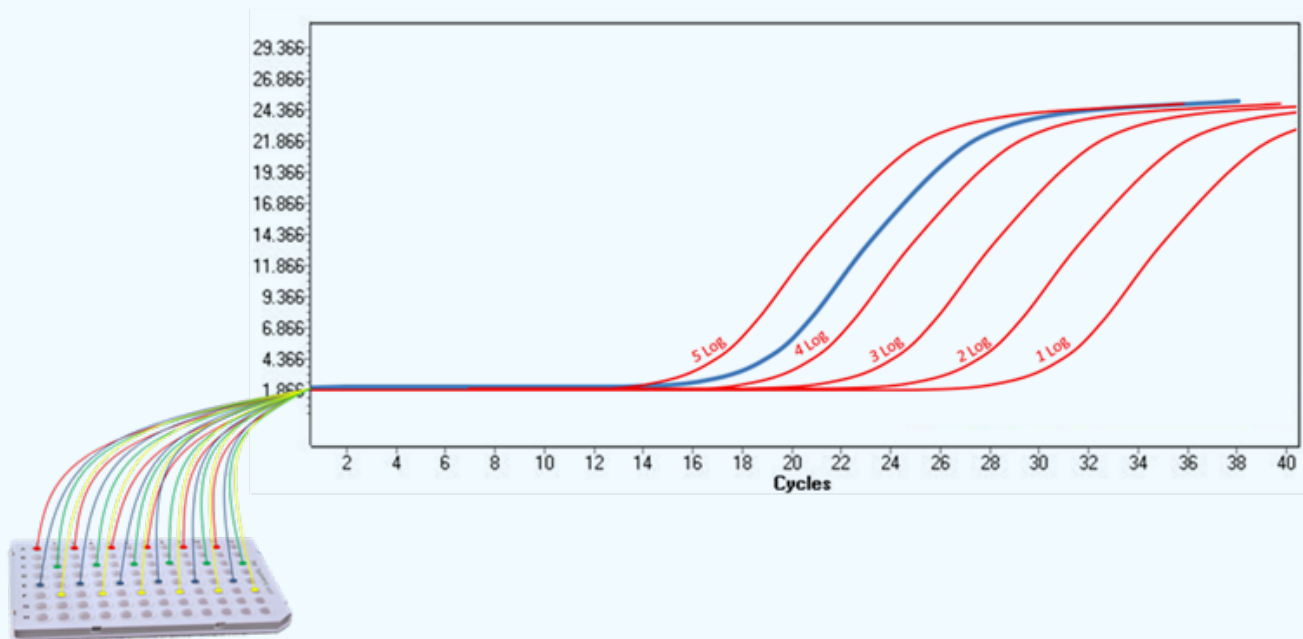


Figure 1: La technique qPCR mesure l'augmentation des fragments d'ADN durant chaque cycle de la PCR. En même temps que l'échantillon à analyser (bleu), la série de référence (rouge) doit être soumise à la PCR

B. Droplet Digital PCR

On a récemment aussi utilisé une nouvelle technologie PCR de 'troisième génération' ou PCR digitale. Droplet Digital PCR (ddPCR) est un exemple de PCR digitale. Avec cette PCR, un échantillon est divisé en milliers de nano-gouttelettes. Chaque gouttelette est ensuite examinée quant à la présence du fragment d'ADN qui est responsable des Shiga-toxines (Figure 2). Les fragments d'ADN sont répartis sur les milliers de gouttelettes de manière à ce que dans l'idéal, une gouttelette ne contienne qu'un seul fragment d'ADN ou n'en contienne pas du tout. Sur base de la répartition des gouttelettes positives et négatives, le logiciel peut réaliser une quantification exacte de l'ensemble de l'échantillon sans pour autant devoir faire l'analyse d'une série de référence, comme c'est le cas pour la qPCR.

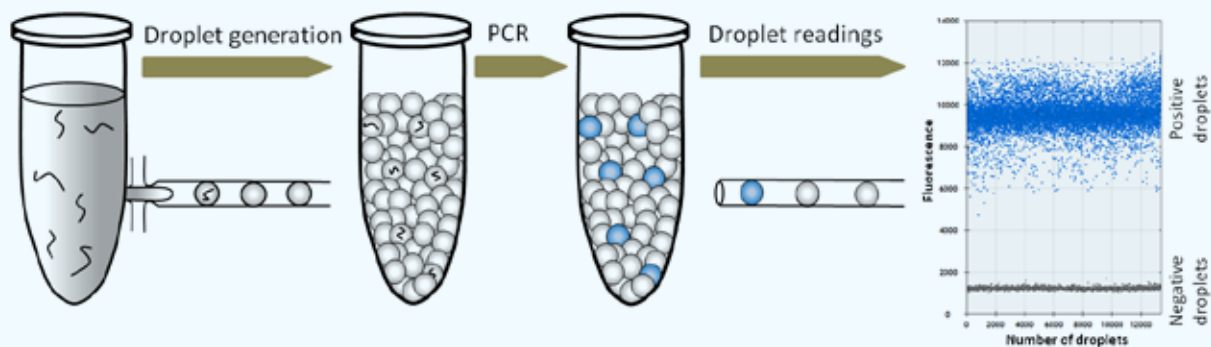


Figure 2: L'aperçu du fonctionnement d'une droplet digital PCR (QX200, Bio-Rad, Marnes-la-Coquettes, France)

Les résultats obtenus pour la quantification des gènes de Shiga-toxines en utilisant la ddPCR sont fort semblables à ceux obtenus avec la qPCR. Seule la quantification de très grandes quantités de fragments d'ADN ne semble pas possible pour la ddPCR étant donné que, dans ce cas, toutes les gouttelettes contiennent un ou plusieurs fragments d'ADN et qu'une répartition des gouttelettes positives et négatives ne peut plus être faite. Cela peut toutefois être résolu simplement en diluant l'échantillon (4).

La présence de substances inhibitrices dans l'échantillon à analyser peut donner lieu à une inhibition de la PCR. Comme illustré dans la Figure 3, une inhibition de la PCR peut donner lieu à un signal plus faible lors de la ddPCR. Mais tant que l'on peut observer une séparation claire entre les gouttelettes positives et négatives, une quantification exacte reste possible. Lors d'une qPCR, une inhibition de la PCR peut en revanche donner lieu à une augmentation différée du nombre de fragments d'ADN, engendrant dès lors une sous-estimation de la quantité de STEC. Toutefois, cette sensibilité de la qPCR à une inhibition de la PCR dépend fortement du mastermix utilisé pour la qPCR (4).

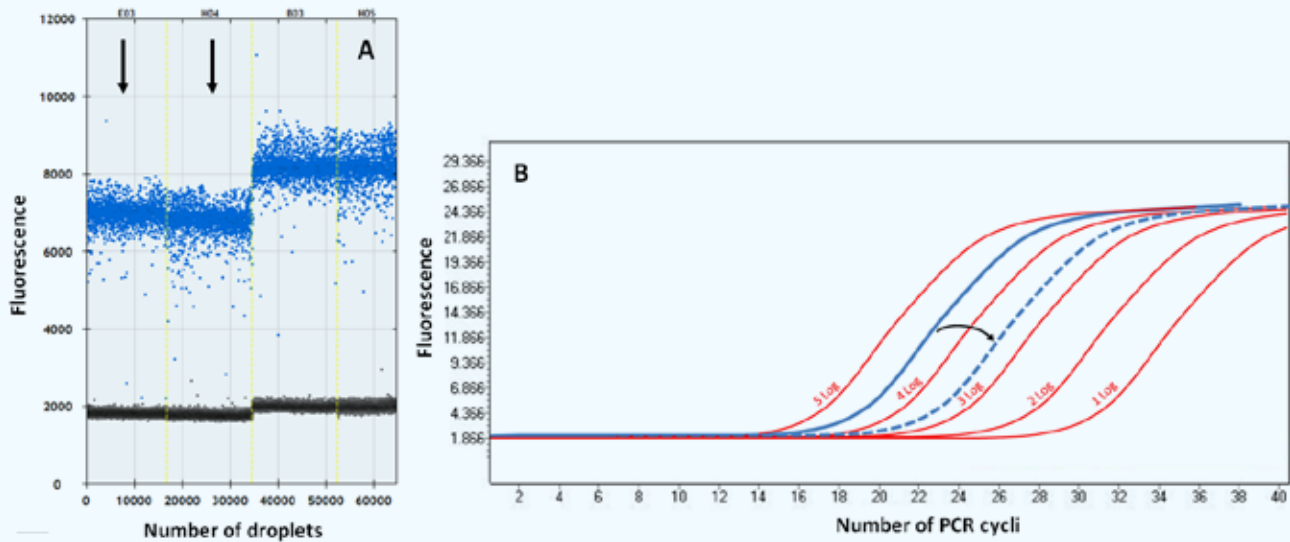


Figure 3: Effet d'une inhibition de la PCR (flèches) sur la quantification de STEC avec une ddPCR (A) et une qPCR (B)

Conclusions

Les deux techniques de quantification d'ADN offrent des avantages évidents quant à la quantification de STEC par rapport aux étalements classiques sur un milieu gélosé. Bien que les résultats des deux techniques soient très comparables, le plus grand avantage de la ddPCR est qu'elle ne requiert pas l'analyse d'une série de référence pour la quantification. Pour ces raisons, l'utilisation de la ddPCR pourrait être envisagée pour l'identification des «super excréteurs de STEC» parmi les bovins, aussi bien pour détecter les principales sources de contamination que pour examiner l'effet des traitements au sein de la population bovine.



Références :

1. Nataro, J.P., Kaper, J.B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. 11, 142–201
2. Persad A.K., LeJeune J.T. (2014). Animal reservoir of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Microbiological Spectrum*. 2 (4), 1-14.
3. Lawal, D., Burgess, C., McCabe, E., Whyte, P., Duffy, G. (2015). Development of a quantitative real time PCR assay to detect and enumerate *Escherichia coli* O157 and O26 serogroups in bovine recto-anal swabs. *Journal of Microbiological Methods*. 114, 9–15
4. Verhaegen B., De Reu K, De Zutter L, Verstraete K, Heyndrickx M., Van Coillie E. (2016). Comparison of Droplet Digital PCR and qPCR for the Quantification of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Bovine Feces. *Toxins*. 8 (157), 1-11.

bavo.verhaegen@ilvo.vlaanderen.be

L'utilisation de la PCR quantitative en temps réel pour le dénombrement des *Campylobacter spp* thermophiles sur les carcasses de volailles

David Triest, Alexandra Duarte, Katelijne Dierick et Nadine Botteldoorn

LNR Microbiologie alimentaire, Juliette Wytsmanstraat 14, 1050 Bruxelles

Tant en Belgique que dans le reste de l'Europe, la campylobactériose est la maladie infectieuse d'origine bactérienne la plus courante. Celle-ci peut se transmettre de l'animal à l'homme. [1] Le contact avec de la viande de volaille infectée par *Campylobacter* ainsi que sa consommation jouent ici un rôle important. La présence de *Campylobacter* dans la viande de volaille est donc suivie de manière rigoureuse et leur recherche fait partie du programme de contrôle officiel de l'AFSCA.

Pour l'instant, il n'y a pas encore de législation européenne relative à la sécurité alimentaire et/ou aux critères d'hygiène des procédés concernant *Campylobacter* sur les carcasses de volaille; mais des négociations sont en cours à ce sujet. Fixer un critère de sécurité alimentaire sur la présence ou l'absence de *Campylobacter* n'est pas faisable, mais par contre un critère d'hygiène des procédés est plus réaliste.

En règle générale, il est supposé que le nombre de *Campylobacter* sur les carcasses de volaille a une incidence considérable sur le nombre de cas de maladies recensés chez l'homme (avis EFSA). [2] La quantification précise de *Campylobacter* sur les carcasses de volaille est dès lors extrêmement importante afin de pouvoir détecter les carcasses fortement contaminées et présenter des mesures spécifiques. Pour la quantification de *Campylobacter*, la méthode de référence ISO/TS 10272-2 (2006) peut être utilisée. Celle-ci est basée sur le dénombrement classique sur le milieu CCDA et nécessite une confirmation des colonies. Ce n'est que 96 heures après l'échantillonnage que le résultat est connu. Afin d'obtenir un résultat plus rapide, on peut utiliser la méthode qPCR. Celle-ci est considérablement plus rapide que la méthode de référence basée sur un milieu de culture. Cette quantification rapide est donc très importante pour l'industrie alimentaire afin de pouvoir entreprendre des actions quand le critère d'hygiène des procédés sera d'application.

Un problème se pose toutefois avec la méthode qPCR standard. Celle-ci n'est en effet pas capable de distinguer les cellules bactériennes vivantes des mortes. Une méthode qPCR adaptée a récemment été développée. Elle offre une solution à ce problème en recourant au PMA (propidium monoazide), réactif liant l'ADN qui permet de distinguer les cellules vivantes des mortes (Figure 1).



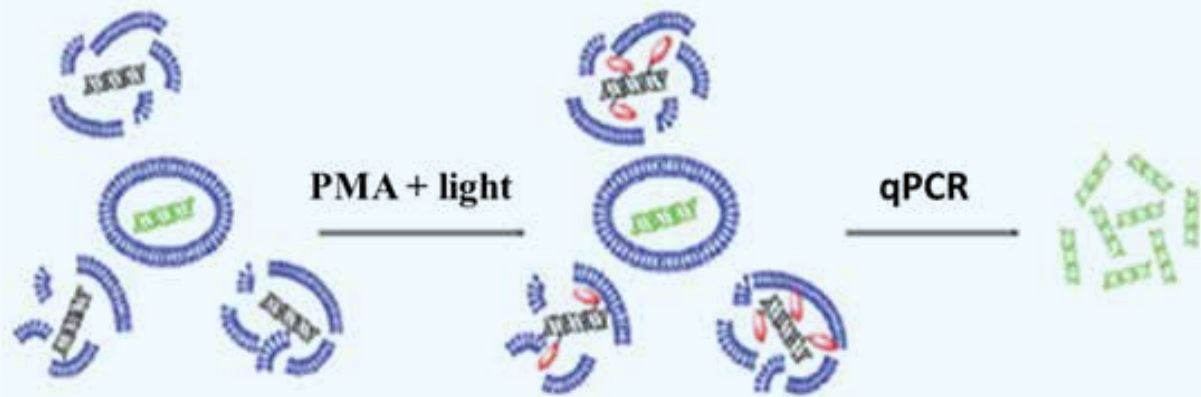


Figure 1 : Principe de la méthode PMA-qPCR.

Après exposition à la lumière, le PMA se lie à l'ADN des cellules présentant une membrane endommagée (cellules mortes). Par conséquent, seul l'ADN des cellules présentant une membrane intacte (cellules vivantes) est amplifié par le biais de la méthode qPCR.

Légende : bleu = membrane, noir = ADN des cellules mortes, vert = ADN des cellules vivantes, rouge = PMA.

Jusqu'à présent, seul un nombre très restreint d'études ont examiné la fiabilité de cette méthode PMA-qPCR – qui ne devrait donc en théorie quantifier que les cellules vivantes – au regard de la méthode de référence. Un aspect important est que les cellules de *Campylobacter* présentes dans les aliments contaminés sont souvent abîmées par les différents procédés de transformation et de conservation auxquels l'aliment est soumis, comme la réfrigération ou la congélation. Ces cellules abîmées sont donc susceptibles de devenir sensibles aux produits qu'elles supportent en temps normal, et il a déjà été démontré que certains produits qui sont utilisés dans la méthode de référence peuvent bel et bien s'avérer mortels pour de telles cellules. Par conséquent, il y a une sous-estimation du nombre de cellules vivantes lorsque l'aliment contaminé est soumis à des «conditions de stress». Cette sous-estimation de la méthode de référence constitue dès lors un danger pour le consommateur car il est possible que des carcasses potentiellement très contaminées ne soient pas détectées.

Jusqu'à présent, la capacité de la méthode PMA-qPCR à quantifier correctement le nombre de cellules vivantes, y compris celles abîmées, n'a pas encore été étudié. L'étude de Duarte *et al.* (2015) [1], réalisée dans le cadre du projet Campytrace au sein du service «Pathogènes alimentaires» du WIV-ISP, a tenté de faire la lumière sur le sujet en testant à la fois la méthode PMA-qPCR et la méthode qPCR standard sur des carcasses de volaille contaminées naturellement et artificiellement par *Campylobacter jejuni* et *Campylobacter coli*. De plus, une comparaison a été faite avec la méthode de référence. La figure 2 donne un aperçu schématique des méthodes étudiées lors de cette étude.

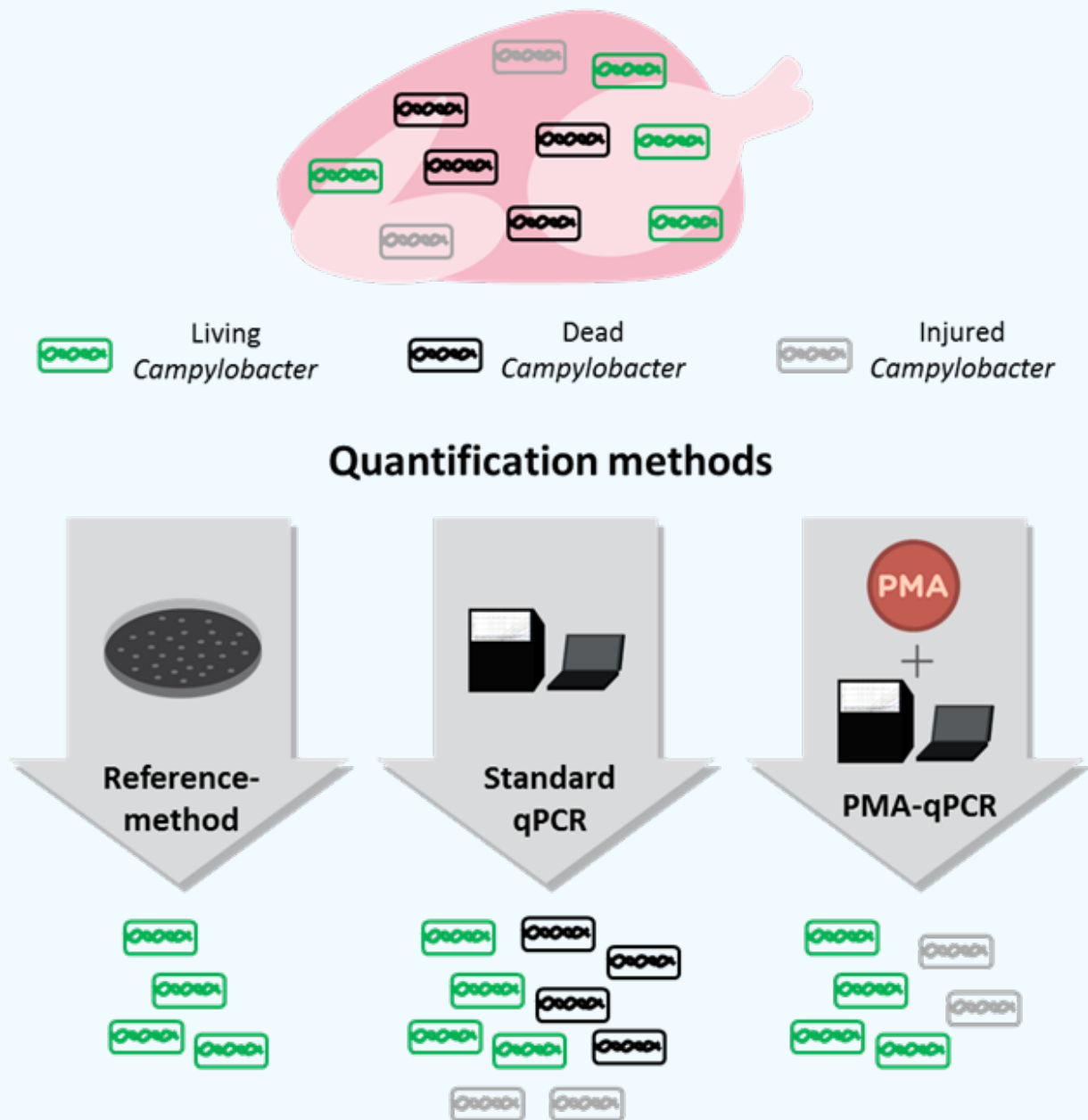


Figure 2 : Méthodes de quantification de *Campylobacter* sur les carcasses de volailles. Dans l'étude de Duarte et al. (2015)¹, trois méthodes ont été comparées: la méthode de référence basée sur un milieu de culture (à gauche), la méthode standard qPCR (au milieu) et la méthode PMA-qPCR (à droite). Contrairement à la méthode de référence et à la méthode PMA-qPCR, la méthode qPCR standard n'est pas capable de distinguer les cellules de *Campylobacter* vivantes (vert) des mortes (noir). Il est possible que des cellules de *Campylobacter* abîmées (en gris) ne soient pas quantifiées dans la méthode de référence en comparaison avec la méthode (PMA-)qPCR.

Cinq conditions de stress auxquelles les carcasses sont en général soumises lors des procédés de transformation et de conservation ont été testées, à savoir l'exposition à la chaleur, au froid, à la congélation, à un traitement acidifiant et à un traitement avec du peroxyde d'hydrogène. Une méthode PMA-qPCR, développée en interne, a dans ce cas-ci été utilisée. Les principales conclusions tirées des résultats obtenus étaient les suivantes : (i) Comme attendu, le résultat de la quantification de *Campylobacter* obtenu avec la méthode classique de dénombrement s'est avéré correspondre le mieux à celui obtenu via la méthode PMA-qPCR, à la place de la méthode qPCR standard. (ii) En comparaison avec la méthode PMA-qPCR, la méthode de référence effectuée bel et bien une sous-estimation du nombre de cellules vivantes dans le cas où les carcasses étaient soumises à la chaleur, au froid, à la congélation ou à un traitement acidifiant. (iii) Un traitement avec du peroxyde d'hydrogène s'est avéré être la seule condition de stress qui n'a pas provoqué une diminution dans le nombre de cellules vivantes de *Campylobacter*, tant avec la méthode de référence que la méthode (PMA-)qPCR, montrant ainsi que *Campylobacter* s'adapte efficacement à cette condition de stress. (iv) La congélation a par contre provoqué la plus grande diminution dans le nombre de cellules vivantes de *Campylobacter*, aussi bien pour la méthode de référence que la méthode PMA-qPCR. Cette dernière indique que la congélation de carcasses peut être une stratégie intéressante pour le développement de directives afin de réduire le nombre de cas de campylobactériose chez l'homme.

Références :

1. Effect of exposure to stress conditions on propidium monoazide (PMA)-qPCR based *Campylobacter* enumeration in broiler carcass rinses (Duarte A, Botteldoorn N, Coucke W, Denayer S, Dierick K, Uyttendaele M. Food Microbiology 48 (2015): 182-190).
2. Scientific opinion on *Campylobacter* in broiler meat production: control options and performance objectives and/or targets at different stages of the food chain (EFSA Panel on Biological Hazards. EFSA Journal 2011: 9(4):2015).

Projet Campytrace RF 11/6241 financé par le Service public fédéral Santé publique, Sécurité de la Chaîne alimentaire et Environnement

Nadine.Botteldoorn@wiv-isp.be

Infections à *Salmonella*: Techniques d'identification aboutissant aux succès des enquêtes

Sophie Bertrand, Wesley Mattheus, Pieter-Jan Ceysens, Mathieu Gand, Raymond Vanhoof
Institut Scientifique de Santé Publique (WIV-ISP), Centre National de Référence des *Salmonella* et *Shigella* (CNRSS),
rue J. Wytsman 14, 1050 Bruxelles, Belgique.

Nadine Botteldoorn, Sarah Denayer
Institut Scientifique de Santé Publique (WIV-ISP), LNR Microbiologie Alimentaire, rue J. Wytsman 14, 1050 Bruxelles,
Belgique.

Nancy Roosens, Sigrig De Keersmaecker
Institut Scientifique de Santé Publique (WIV-ISP), Plateforme de Biotechnologie et Biologie Moléculaire (PBB), rue
J.Wytsmanstraat14, 1050 Bruxelles, Belgique

Introduction :

Les infections à *Salmonella* restent, malgré tous les efforts déployés au cours des dernières décennies, un problème majeur de Santé Publique. Elles représentent, en effet, dans les pays occidentaux la deuxième cause de gastro-entérite bactérienne après les infections à *Campylobacter*. Si la majorité des Salmonelloses ne nécessite pas un traitement aux antibiotiques, dans certains cas (par exemple pour les personnes âgées, immunodéprimées ou les enfants en bas âge) une antibiothérapie est incontournable. Cependant même dans le cas où aucun traitement n'est nécessaire, la personne infectée présente des symptômes (fièvres, diarrhées, vomissements, maux de tête) pendant plusieurs jours justifiant une période d'incapacité de travail plus ou moins longue ce qui inévitablement représente un coût pour la société. Il est donc crucial de limiter le plus rapidement possible le nombre de personnes malades en retirant les produits contaminés du marché.

Système de surveillance mis en place en Belgique :

Comme la plupart des pays européens, la Belgique s'est dotée d'un système de surveillance des *Salmonella* très performant. Ce système est basé sur le suivi des Salmonelloses dans la population grâce aux travaux du Centre National de Référence (CNRSS) combiné à une surveillance des denrées alimentaires et du secteur primaire réalisées grâce à la collaboration étroite entre l'Agence pour le Sécurité des Aliments (AFSCA), les laboratoires nationaux de références (LNR, secteur alimentaire) et le CNRSS.

En pratique, les souches des patients, les souches isolées des denrées alimentaires et du secteur vétérinaire sont acheminées au CNRSS ou au LNR afin d'être typées, sous typées et comparées entre elles dans le but de détecter les sources de contamination et de les éliminer. Il est d'ailleurs à noter qu'à partir de janvier 2017, tous les typages et sous-typages seront réalisés au sein du CNRSS, facilitant encore plus la comparaison des données.



Méthodes classiques de typage des souches de Salmonella :

Les *Salmonella* sont des bactéries appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*, sont divisées en deux espèces (*S. enterica* et *S. bongori*) et *S. enterica* est elle-même subdivisée en 6 sous-espèces. Les *Salmonella* comptent plus de 2579 sérotypes déterminés par la recherche des antigènes somatiques O, flagellaires H et de surface (Vi) au moyen d'anticorps spécifiques selon le schéma de Kauffmann et White.

En pratique toutes les souches acheminées au CNRSS et au LNR sont donc soumises à une première analyse par agglutination sur lame afin de déterminer le sérotype (Figure 1). Cette première analyse est essentielle mais bien souvent insuffisante pour trouver l'origine d'une contamination. En effet, la majorité (85%) des infections à *Salmonella* dans les pays occidentaux sont liées seulement à une petite dizaine de sérotypes différents sur les 2600 existants (1 et Figure 2). Des sous-typages de ces souches sont dès lors fondamentaux pour établir un lien formel entre la souche alimentaire et la souche du patient.

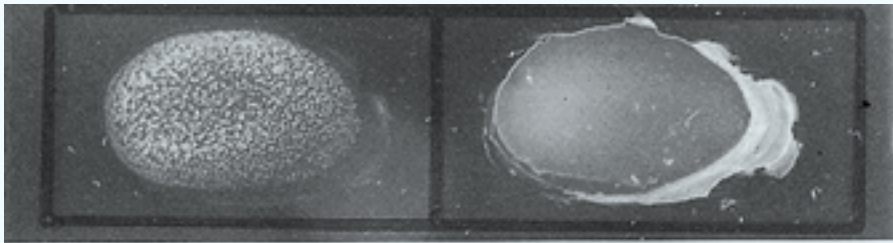


Figure 1. Agglutination sur lame ; à gauche : réaction positive ; à droite réaction négative.

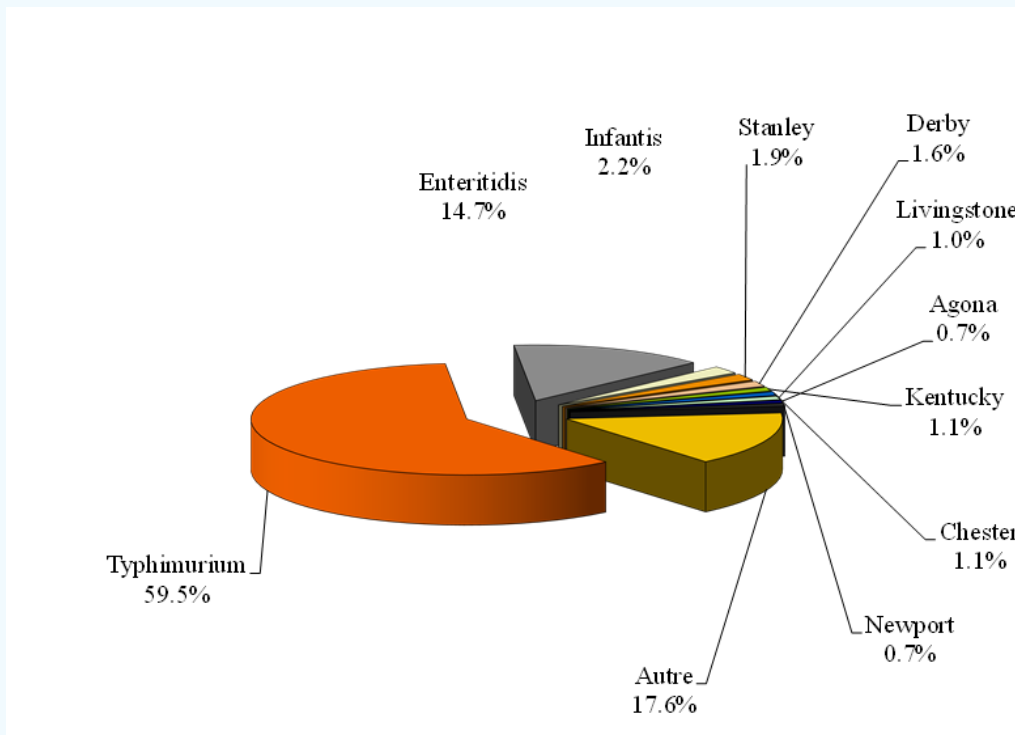


Figure 2 : Les dix principaux sérotypes d'infection à *Salmonella* chez l'Homme en Belgique en 2015

Techniques de sous-typage :

1) L'électrophorèse en champ pulsé :

Cette technique consiste à comparer les souches entre elles grâce au profil de migration de leurs fragments d'ADN dans un champ pulsé (Figure 3). Même si cette technique commence à être désuète de nos jours, elle a largement fait ses preuves dans de nombreuses enquêtes autour d'épidémies à *Salmonella* au cours de cette dernière décennie (2, 3). En Belgique, elle a notamment permis de trouver l'origine de la contamination lors de l'épidémie à *Salmonella* Ohio en 2005 (3). Cette enquête fut un réel succès puisqu'elle a non seulement ciblé la source de contamination mais a aussi permis d'établir les mesures à mettre en place pour décontaminer les machines et leurs rouages ainsi que d'éclaircir les voies de communications des règles d'hygiène à utiliser par rapport à des saisonniers ne maîtrisant pas toujours les langues nationales (3).

La technique d'électrophorèse en champ pulsé présente également l'avantage d'être universelle et donc de pouvoir être appliquée sur les 2600 sérotypes différents des *Salmonella*.

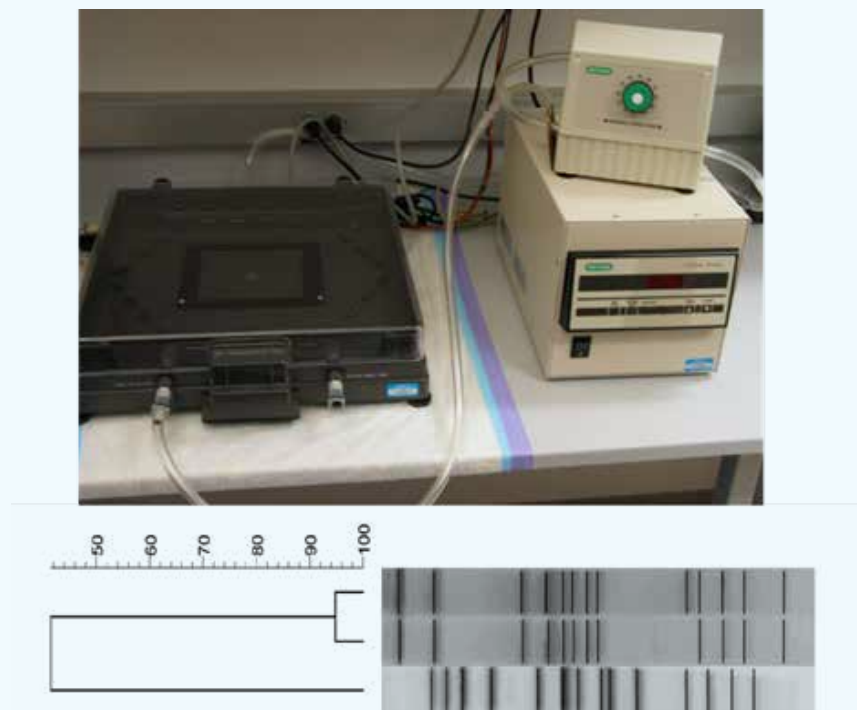


Figure 3 : Appareil d'électrophorèse en champ pulsé et exemple de 3 profils d'ADN comparés par cette méthode.

2) MLVA (Multiple Loci Variable Number of Tandem Repeats Analysis):

Cette technique vise à comparer les souches de *Salmonella* entre elles par rapport à la longueur et le nombre de répétition de certaines régions répétées de leur génome. Deux souches seront considérées comme identiques ou proches en fonction de l'absence de variation ou de variations limitées de ces régions répétées. Cette technique n'est malheureusement pas universelle et requiert un développement spécifique pour chaque sérotype. Actuellement cette technique est utilisée en routine en Belgique pour le sous-typage des deux sérotypes les plus fréquents dans les infections à *Salmonella* : *S. Enteritidis* (5) et *S. Typhimurium* (4).

Nous avons également montré pour *S. Typhimurium* que cette technique était parfois trop discriminative (forte variation de certaines régions répétées au sein de souches proches ou identiques) (4). Pour *S. Enteritidis* qui est considéré comme un des sérotypes le plus clonal parmi les 2600, cette technique est très discriminative même si un profil majoritaire a pu être détecté dans 28% des souches testées en Belgique (5). La réalisation de ces sous-typages en routine a permis récemment de participer à l'enquête d'une épidémie à *Salmonella* Enteritidis affectant plusieurs pays européens et de trouver la source de la contamination (Figure 4).

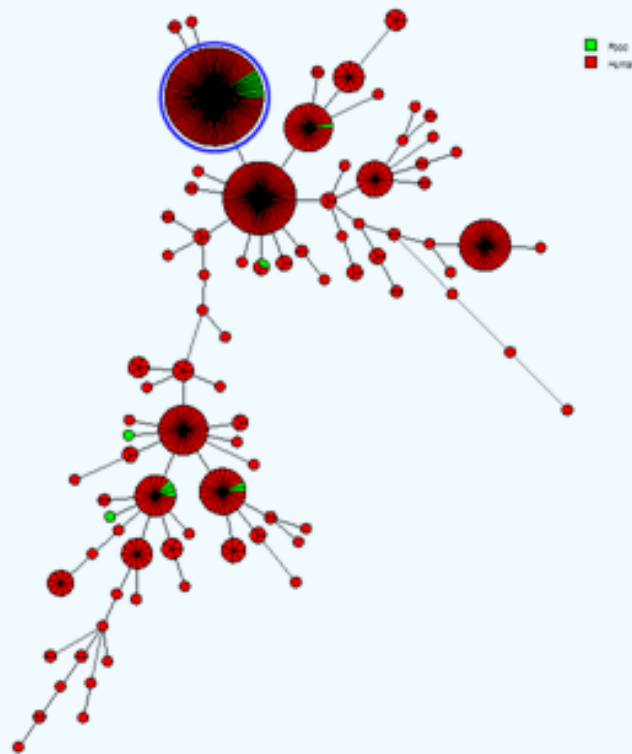
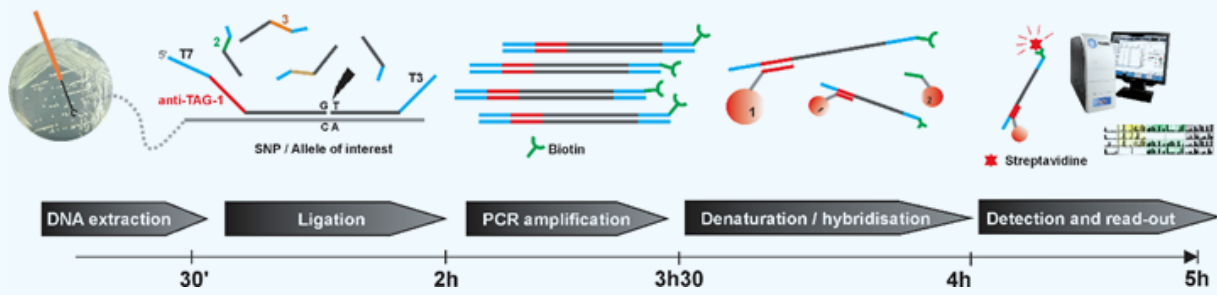


Figure 4 : Arbre phylogénétique représentant les différents profils MLVA de souches de *Salmonella* d'origine humaine en rouge et alimentaire en vert isolées en 2016, le cercle bleu dans la figure indique le profil lié à l'épidémie détectée dans plusieurs pays européens.

- 3) Séquençage à haut débit ou *Next Generation Sequencing* (NGS) : Cette technique consiste à séquencer l'ensemble du génome de la souche ici de *Salmonella* et de comparer ensuite les génomes entre eux. Cette technique représente la grande révolution à laquelle les laboratoires de microbiologie doivent faire face à l'heure actuelle puisqu'elle pourrait remplacer les méthodes classiques de typage et de sous-typage et qu'elle est universelle. Il existe au moins deux méthodes de comparaisons de ces séquences génomiques : comparaison du « core genome MLST » et comparaison des mutations ponctuelles. La méthode de « core genome MLST » permet de comparer entre elles les séquences de plusieurs milliers de gènes dits de « ménage ». C'est actuellement la méthode qui permet une harmonisation rapide de la comparaison réalisée entre laboratoires ou entre différents pays. La comparaison des mutations ponctuelles est sans doute la méthode la plus discriminative et peut être de ce fait, trop discriminative. Elle impose une harmonisation poussée de cette analyse entre laboratoires ainsi que l'établissement d'une nomenclature permettant d'échanger les informations de manière compréhensible entre les différents intervenants. Moyennant ces étapes d'harmonisation, il s'agit d'une méthode universelle qui commence à être utilisée avec succès dans les enquêtes autour d'épidémies à *Salmonella* notamment en Belgique (6). Elle a montré récemment toute son importance et sa valeur ajoutée dans une enquête autour d'une épidémie touchant plusieurs pays européens puisqu'elle a permis de distinguer 3 groupes de souches différentes (donc 3 origines de contamination différentes) au sein d'une population de *Salmonella* Enteritidis présentant un profil MLVA très rare (données en cours de publication). Cependant, cette technique est à l'heure actuelle très coûteuse (surtout si elle doit être mise en place pour l'analyse d'un nombre limité de souches) et manque, encore pour le moment, de rapidité. Il faut, en effet, plus d'une semaine entre l'arrivée des échantillons au laboratoire et l'obtention des séquences couplées à leur analyse. Tous ces paramètres sont actuellement analysés par la communauté scientifique afin de positionner cette technique prometteuse et universelle dans la panoplie des tests disponibles et d'évaluer correctement le coût/efficacité de l'introduction de cette technique en routine dans nos laboratoires d'analyse.
- 4) Techniques de génotypage ciblé : Quand seulement certaines caractéristiques d'une bactérie doivent être mises en évidence (exemple l'absence ou la présence de certains gènes conférant une résistance à certains antibiotiques), une approche par génotypage ciblé est certainement bien plus efficace et rentable qu'une analyse du génome complet. Au CNRSS, nous avons récemment développé et validé de nouvelles méthodes basées sur la technologie Luminex permettant (i) le sous-typage des *S. Typhimurium* (7) et la détection de la présence de plus de 50 gènes ou mutations responsables de la résistance (ii) aux beta-lactames (8) et (iii) aux fluoroquinolones (Figure 5). Cette méthode est basée sur l'émission de signaux fluorescents liés à la présence des gènes cibles ou des mutations ponctuelles. Fort de cette expérience, nous sommes également occupés à développer un test qui permettra le génosérotypage (ou sérotypage basé sur l'ADN) des sérotypes les plus fréquemment rencontrés dans le porc et la volaille en Belgique (Projet Salmstid). Cette technique sera mise à disposition des laboratoires de première ligne dans le but de gagner du temps dans la course à la détection des *Salmonella* à combattre selon la directive européenne (EU regulation N°2160/2003). Le grand avantage de cette technique multiplex est qu'elle permet d'analyser une grande quantité de souches en même temps (96 échantillons/analyse), qu'elle est bon marché et qu'elle est facilement adaptable à de nouvelles cibles.





Figures 5 : Schéma représentant les différentes étapes de l'analyse par la technique de génotypage ciblé « Luminex »

Conclusions :

Il existe donc à l'heure actuelle plusieurs méthodes permettant le typage et le sous-typage des *Salmonella* permettant d'identifier la source de contamination et de l'éliminer. Ces méthodes présentent chacune des avantages et des inconvénients. Le choix de la méthode utilisée dépend donc de la situation à laquelle nous sommes confrontés, du nombre d'échantillons à analyser ainsi que du temps et du budget disponible.

Références :

1. CNR *Salmonella* & *Shigella*. Rapport annuel 2015. Souches de *Salmonella* & *Shigella* isolées en Belgique en 2015. D/2016/2505/19. 2016.
2. Kinross, P., van Alphen, L., Martinez Urtaza, J., Struelens, M., Takkinen, J., Coulombier, D., Makela, P., Bertrand, S., Mattheus, W., Schmid, D., Krisztalovics, K., Frank, C., Mooijman, K., Gossner C. Multidisciplinary investigation of a cross-border outbreak of *Salmonella* Stanley infections associated with turkey meat in the EU, 2011-2012. *Eurosurveillance*, vol 19 (19). 2014.
3. Bertrand S., Dierick K., Heylen K., De Baere T., Pochet B., Robesyn E., Lokietek S., Van Meervenne E., Imberechts H., De Zutter L. & Collard J.-M. Lessons learned from the management of a national outbreak of *Salmonella* Ohio linked to pork meat processing and distribution. *J. of Food Protection*, 73 (3) 529-534, 2010.
4. Wuyts, V., De Laminne de Bex, G., Wildemauwe, C., Roosens, N. H.C., Marchal, K., Mattheus, W., C.J. De Keersmaecker, S., Bertrand S. Investigation of the added value of multiple-locus variable-number of tandem repeats analysis (MLVA) for public health surveillance of human *Salmonella* enterica subsp. enterica serovar Typhimurium in Belgium, 2010-2012. *PlosOne*. 31; 8(12). 2013.
5. Bertrand S, De Lamine de Bex G, Wildemauwe C, Lunguya O, Phoba MF, Ley B, Jacobs J, Vanhoof R, Mattheus W. Multi Locus Variable-Number Tandem Repeat (MLVA) Typing Tools Improved the Surveillance of *Salmonella* Enteritidis: A 6 Years Retrospective Study. *PLoS One*. Feb 18;10(2):e0117950. 2015
6. Wuyts V, Denayer S, Roosens NH, Mattheus W, Bertrand S, Marchal K, Dierick K, De Keersmaecker SC. Whole Genome Sequence Analysis of *Salmonella* Enteritidis PT4 Outbreaks from a National Reference Laboratory's Viewpoint. *PLoS Curr. Outbreaks* Sep11 ; 7. 2015
7. Wuyts V, Mattheus W, Roosens N, Marchal K, De Keersmaecker S. A and Bertrand S multiplex oligonucleotide ligation-PCR as a complementary tool for subtyping of *Salmonella* Typhimurium *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2015,6831.DOI: 10.1007/s00253-015-6831-7
8. Ceysens PJ, Garcia-Graells C, Fux F, Botteldoorn N, Mattheus W, Wuyts V, De Keersmaecker S, Dierick K, Bertrand S. Development of a Luminex xTAG® assay for cost-effective multiplex detection of β -lactamases in Gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother*. 2016, 2016 Sep;71(9):2479-83.

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. 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. L'étude Salmstid est financé par le SPF Santé Publique (Contrat RT 14/5, Salmstid1).

Sophie.bertrand@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 > 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'infos (site web)
8-12.05.2017	The IDF/ISO Analytical Week 2017	Madison, Wisconsin, United States of America	http://www.fil-idf.org/events/upcoming-events/
15.05.2017	Colloquium Wie doet wat voor bijen?	Koninklijk Belgisch Instituut voor Natuurwetenschappen	http://www.levedebijen.be/Bijen/nl/colloquium/inschrijvingspagina_696.aspx
23.05.2017	International symposium on crop protection	Gent, Belgium	http://www.ugent.be/bw/crop-protection/iscp/en
24.05.2017	Trends in Food Analysis VIII	Gent, Belgium	Organised by the Flemish Chemical Society – Food section https://www.kvcv.be/index.php/nl/trends-in-food-analysis-viii
29.05 – 2.06.2017	12th European Foundation of Plant Pathology meeting	Dunkerque, France	http://efpp12sfp10.univ-littoral.fr/
1-2/06/2017	8th International Fresenius Conference "Health Claims and Functional Ingredients"	Atrium Hotel Mainz/Germany	https://www.akademie-fresenius.com/events/detail/produkt/8th-international-fresenius-conference-health-claims-and-functional-ingredients/
4-8.06.2017	14th Symposium on Bacterial Genetics and Ecology	Aberdeen, Scotland	http://www.bageco.org/
19-20.06.2017	19th International Fresenius AGRO Conference "Behaviour of Pesticides in Air, Soil and Water"	Atrium Hotel Mainz/Germany	https://www.akademie-fresenius.com/events/detail/produkt/19th-international-fresenius-agro-conference-behaviour-of-pesticides-in-air-soil-and-water/
19-21.06.2017	4th World Congress on Mass Spectrometry	London, England	http://massspectrometryeurope.blogspot.be/
21-22.06.2017	6th International Fresenius Conference "Residues of Food Contact Materials in Food"	Park Inn by Radisson Köln City West, Cologne/Germany	https://www.akademie-fresenius.com/events/detail/produkt/6th-international-fresenius-conference-residues-of-food-contact-materials-in-food/

25-28.06.2017	CoCoTea 2017 : 4th International Conference on Cocoa Coffee and Tea	Turin, Italy	www.cocoteacongress.com/
09-12.07.2017	IAFP Annual meeting (IAFP = International Association Food Protection)	Florida, USA	https://www.foodprotection.org/annualmeeting/
09-13.07.2017	FEMS 7th Congress of European Microbiologists	Valencia, Spain	http://www.fems-microbiology2017.kenes.com/landing/Pages/default.aspx
13-14.07.2017	International Conference on Food Contaminants (ICFC 2017) in Braga, from the 13th to the 14th of July 2017	Braga, Portugal	http://www.icfc2017.uminho.pt/
7-9.08.2017	4th World Congress on Chromatography	Rome, Italy	http://chromatography.conferenceseries.com/
20-25.08.2017	37th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (POPs) - DIOXIN 2017	Vancouver, Canada	http://www.dioxin2017.org/
28-30.08.2017	8th Annual Congress on Analytical and Bioanalytical Techniques	Bruxelles / Belgium	http://analytical-bioanalytical.alliedacademies.com/scientific-program-pdfs
7-8.09.2017	The 3rd international INSECTA conference 2017	Berlin, Germany	The conference aims to give an overview of the state-of-the-art of insect technology and the prospects and constraints of the use of insects as food, feed and non-food in Europe and worldwide. Technological, commercial, ecological, political and ethical issues are discussed. http://insecta-conference.com/
18-19.09.2017	46th World Congress on Microbiology	Dublin, Ireland	Theme: Perceiving the challenges of the inter-disciplinary world of microbes through Research, Response & Regulation http://microbiology.conferenceseries.com/europe/
21-22.09.2017	22nd Conference on Food Microbiology	Brussels, Belgium	Organized by the Belgian Society for Food Microbiology vzw/aslb (BSFM) www.bsfm.be
11-14.09.2017	1st MycoKey International Conference Global Mycotoxin Reduction in the food and feed chain	Ghent, Belgium	http://www.mycokey.eu/global-mycotoxin-reduction-in-the-food-and-feed-chain-first-announcement/
21.09.2017	Darmgezondheid: gezondheid zit in de darmen	Breda, Nederland	http://www.aoaclowlands.nl
24-27.09.2017	131st AOAC INTERNATIONAL Annual Meeting And Exposition	Atlanta, USA	https://www.aoac.org/AOAC_Prod_Imlis/iCore/Events/Event_Display.aspx?EventKey=17AM&WebsiteKey=c-f9be5e4-94bf-42f8-9cad-561acbe5ce94



1-4.10.2017	3rd IMEKOFODS Conference "Metrology Promoting Standardization and Harmonization in Food and Nutrition"	Thessaloniki, Greece	http://imekofoods3.web.auth.gr
04-06.10.2017	EuroFoodChem XIX Conference	Budapest, Hungary	http://www.eurofoodchem2017.mke.org.hu/
18-20.10.2017	2nd World Conference on Innovative Animal Nutrition and Feeding (WIANF)	Budapest, Hungary	http://wianf.akcongress.com/index.php/conference
25-26.10.2017	11th International Fresenius Conference "Contaminants and Residues in Food"	Atrium Hotel Mainz/Germany	https://www.akademie-fresenius.com/events/detail/produkt/11th-international-fresenius-conference-contaminants-and-residues-in-food/
29.10.2017 – 03.11.2017	IDF World Dairy Summit 2017	Belfast, United Kingdom	http://www.fil-idf.org/events/upcoming-events/
07-10.11.2017	8th International Symposium on RECENT ADVANCES IN FOOD ANALYSIS (RAFA), Recent Advances in Food Analysis	Prague, Czech Republic	www.rafa2017.eu http://www.rafa2017.eu/pdf/Flyer/FLYER_RAFA_2017_02-01-2017.pdf
4-7.12.2017	International miCROPe Symposium 2017 MICROBE-ASSISTED CROP PRODUCTION - OPPORTUNITIES, CHALLENGES & NEEDS	Vienna, Austria	http://micrope.org/





Labinfo