

Détection des protéines animales transformées : expérience et perspectives européennes

B.M. Plouvier⁽¹⁾, V. Baeten⁽²⁾, J.P. Maudoux⁽³⁾, E. Vanopdenbosch⁽⁴⁾,
D. Berkvens⁽⁵⁾, G. Degand⁽⁶⁾ & C. Saegerman⁽¹⁾

(1) Épidémiologie et analyse de risques appliquées aux sciences vétérinaires (UREAR-ULg), Département des maladies infectieuses et parasitaires, Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège, Boulevard de Colonster 20, B42, B-4000 Liège, Belgique

(2) Centre wallon de recherches agronomiques, Département valorisation des productions agricoles, Unité qualité des produits, Chaussée de Namur 24, B-5030 Gembloux, Belgique

(3) Agence fédérale pour la sécurité de la chaîne alimentaire, CA Botanique, Food Safety Center, Boulevard du Jardin botanique 55, B-1000 Bruxelles, Belgique

(4) Centre d'étude et de recherches vétérinaires et agrochimiques, Groeselenberg 99, B-1180, Uccle, Belgique

(5) Département de santé animale, Institut de médecine tropicale Prince Leopold, Nationalestraat 155, B-2000 Anvers, Belgique

(6) Service d'analyse des denrées alimentaires, Département des denrées alimentaires, Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège, Boulevard de Colonster 20, B43bis, B-4000 Liège, Belgique

Correspondance : Prof. Claude Saegerman ; tél. : +32.(0)4/366.45.79 ; fax : +32.(0)4/366.42.61 ; Claude.Saegerman@ulg.ac.be

Résumé

Le Règlement européen 152/2009/CE impose la microscopie optique comme méthode de référence pour les contrôles officiels visant à détecter des traces de protéines animales dans l'alimentation animale. Depuis le 1^{er} juillet 2004, la technique à un solvant est la seule variante de la microscopie optique autorisée. Son seuil de détection admis est de 0,1 % de farine de viandes et d'os. D'autres techniques de biologie moléculaire (amplification en chaîne par polymérase [PCR], immunologie), de microscopie ou d'imagerie proche infrarouge ont été développées depuis ces dix dernières années afin de suppléer la méthode officielle qui présente certaines limitations. Un comparatif des différentes techniques est présenté et discuté afin de mettre en exergue les points forts de chacune des techniques et de proposer un schéma de contrôle envisageable pour améliorer la sensibilité et la spécificité de la technique de détection des protéines animales transformées dans l'alimentation du bétail.

Mots-clés

Contaminations croisées – Éléments en traces – Encéphalopathie spongiforme bovine – Europe – Farines animales – Protéines animales transformées – Techniques de détection.

Introduction

Les encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST) sont des maladies dégénératives du système nerveux central (SNC) (27, 41). Elles se retrouvent dans de nombreuses espèces animales (82) comme chez les bovins, où la maladie porte le nom d'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) (115). Chez l'homme, il y a notamment la maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ) et son nouveau variant (vMCJ) (25, 42, 118). L'agent responsable des EST a été découvert par Stanley Prusiner (77). Il s'agit d'une protéine

infectieuse nommée « prion », forme contractée de *proteinaceous infectious particle*. En 1986, l'ESB a été reconnue cliniquement comme une nouvelle pathologie neurodégénérative en Grande Bretagne et, ultérieurement, a été la cause des nouveaux cas du vMCJ (15, 57, 58, 115). Cependant, il ne peut pas actuellement être exclu, en raison de leur diversité, que des EST animales autres que l'ESB, puissent être transmissibles à l'homme (31, 33). La situation mondiale actuelle concernant l'ESB est visualisable sur le site de l'Organisation mondiale de la santé animale (72, 73, 74). La cause la plus probable de

Encadré I**Liste des abréviations**

Ac :	anticorps	MCJ :	maladie de Creutzfeldt-Jakob
Acm :	anticorps monoclonal	MO :	microscopie optique
Acp :	anticorps polyclonaux	MRS :	matériels à risque spécifiés
ADN :	acide désoxyribonucléique	NIR camera :	caméra proche infrarouge (<i>near infra-red camera</i>)
ADNc :	acide désoxyribonucléique complémentaire	NIRM :	microscopie proche infrarouge (<i>near infra-red microscopy</i>)
AFSCA :	Agence fédérale pour la sécurité de la chaîne alimentaire	NIRS :	spectroscopie proche infrarouge (<i>near infra-red spectroscopy</i>)
Ag :	antigène	PAT :	protéines animales transformées
ARN :	acide ribonucléique	PCR :	amplification en chaîne par polymérase (<i>polymerase chain reaction</i>)
Ct :	nombre de cycles nécessaires pour atteindre un niveau défini de fluorescence relative permettant la détection du signal, à une température définie	PrP :	protéine prion
ELISA :	test immuno-enzymatique (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)	Pr ^{Pres} :	protéine prion résistante à la protéinase K
ESB :	encéphalopathie spongiforme bovine	Pr ^{Sc} :	isoforme anormal de la protéine prion
EST :	encéphalopathie spongiforme transmissible	Q-PCR :	PCR quantitative
EURL-AP :	Laboratoire de référence communautaire pour les protéines animales	RFLP-PCR :	technique de polymorphisme de longueur des fragments de restriction sur une PCR (<i>restriction fragment length polymorphism PCR</i>)
Fc :	fragment d'anticorps correspondant à la fraction constante	rtPCR :	PCR en temps réel
FN :	résultat faux négatif	Se :	sensibilité
FP :	résultat faux positif	SNC :	système nerveux central
FVO :	farine de viandes et d'os	Sp :	spécificité
GTH :	triheptanoate de glycérol	Tnl :	troponine I
HPLC :	chromatographie liquide à haute performance (<i>high pressure liquid chromatography</i>)	TTL :	traitement thermique légal
IR :	infrarouge	vMCJ :	nouveau variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob
LNR :	Laboratoire national de référence	VN :	résultat vrai négatif
LOD :	limite de détection	VP :	résultat vrai positif
LOQ :	limite de quantification	VPN :	valeur prédictive négative
MBM :	farine de viandes et d'os (<i>meat and bone meal</i>)	VPP :	valeur prédictive positive

la crise de l'ESB est l'alimentation des bovins avec des farines de viandes et d'os (FVO) ou farines animales contaminées par de la protéine prion résistante à la protéinase K (Pr^{Pres}) (116, 117). Ces FVO permettent d'enrichir à faible coût les concentrés en calcium et phosphore et acides aminés essentiels pour les animaux en lactation ou en croissance. Au Royaume-Uni, épice de la crise, les premiers cas cliniques confirmés d'ESB sont apparus durant les années 80 (26) suite à une modification de la procédure de production des FVO au cours des années 70 pour des raisons économiques et sécuritaires en supprimant les solvants organiques utilisés pour extraire les graisses et le nettoyage des farines à la vapeur (traitement thermique à 125 °C en phase humide utilisé pour éliminer les traces de solvants). Cependant aucune procédure pour la fabrication de FVO ne permet d'inactiver complètement la Pr^{Pres} (44, 89). C'est pour cette raison que l'interdiction des protéines animales transformées (PAT) dans l'alimentation des ruminants fut instaurée : elle fut tout d'abord décrite dans la Décision n° 1994/381/CE (88), puis elle s'est élargie à tous les animaux d'élevage destinés à la consommation humaine

pour devenir une interdiction alimentaire étendue (*total meat-and-bone meal ban, total MBM ban*), qui a pris effet au 1^{er} janvier 2001 (92). Les farines de poisson sont également interdites dans l'alimentation des ruminants depuis le 1^{er} janvier 2001 (93), excepté pour les ruminants non sevrés (102) ; le cannibalisme est également prohibé depuis 2003 (96) (Tableau I).

Tableau I
Présence de protéines animales en fonction des espèces animales (93, 102)

Types de protéines dans l'aliment	Espèces cible			
	Ruminant	Porc	Volaille	Poisson
Ruminant (sauf lactoreplaceurs)	☒	☒	☒	☑
Porc	☒	☒	☒	☑
Volaille	☒	☒	☒	☑
Poisson	☒	☑	☑	☑

☒ : interdit
☑ : autorisé

La sécurité de la chaîne alimentaire est garantie par l'interdiction totale des farines animales et son contrôle, le traitement thermique légal (TTL) des PAT, le contrôle des contaminations croisées dans les farines animales, la surveillance passive (clinique), la surveillance active (récolte de données épidémiologiques en continu sur un échantillon représentatif de la population ou d'une sous-population présumée à risque), et surtout par le retrait des matériels à risque spécifiés (MRS) (1, 30, 34, 99, 100). En complément de ce dispositif, la traçabilité de la production d'aliments pour le bétail doit être effective (95) grâce à la tenue de registres.

Le contrôle de l'interdiction des PAT est réalisé à l'aide d'une méthode officielle de détection des protéines animales qui est la microscopie optique (MO) (90, 101). D'autres méthodes telles que des méthodes spectroscopiques ou celles basées sur la biologie moléculaire comme l'amplification en chaîne par polymérase en temps réel (PCR) ou encore des tests immunologiques peuvent être utilisées (40, 104). Cet article a pour objectif de comparer les différentes techniques de détection disponibles en vue d'établir un schéma de testage envisageable. Outre les perspectives d'utilisation d'autres techniques de détection que la MO, l'originalité de cet article réside dans le fait qu'il apporte une réponse circonstanciée aux questions légitimes suivantes : le traitement thermique appliqué à l'échantillon analysé est-il conforme à la législation européenne ? Les protéines retrouvées dans l'alimentation du bétail sont-elles des protéines d'origine animale prohibée ? Si oui, en quelle quantité ?

Objets, échantillonnage, lieu d'analyse et expression des résultats

Objet de la détection

La détection a pour objet les PAT qui sont des protéines animales dérivées entièrement de la catégorie 3, c'est-à-dire des sous-produits d'animaux destinés à la consommation humaine. En accord avec la législation européenne, ces protéines animales de catégorie 3 sont, après une transformation, directement utilisables comme matière première pour les animaux de compagnie (*pet food*). Le terme PAT n'inclut pas les produits dérivés de sang, du lait et des produits à base de lait, du colostrum, de la gélatine, des protéines hydrolysées, du phosphate dicalcique, des œufs et dérivés d'œufs, du phosphate tricalcique et du collagène (92). Il existe deux autres catégories de sous-produits animaux : des déchets issus de carcasses impropres à la consommation humaine (catégorie 1) ou douteuses (catégorie 2). Les différentes catégories 1, 2 et 3 sont

définies respectivement dans les articles 4, 5 et 6 du règlement (CE) n° 1774/2002 (96). En outre, la législation européenne impose le traitement thermique des PAT à 133 °C, pendant 20 min et à une pression de 3 bars, sur des particules dont la taille n'excède pas 5 cm (91, 96). Les différentes catégories sont marquées d'un code de couleur : la couleur noire est utilisée pour marquer les sous-produits de la catégorie 1, la couleur jaune pour la catégorie 2 et la couleur verte pour la catégorie 3. Les catégories 1 et 2 sont additionnées d'une odeur et d'un marquage indélébile au triheptanoate de glycérol (GTH) sauf exception, et applicable depuis le 1^{er} juillet 2008 comme stipulé dans le Règlement européen (CE) n° 1432/2007 (98).

L'échantillonnage

L'échantillonnage imposé par la législation européenne doit être représentatif du marché de l'alimentation animale d'un État membre. Pour la première fois en 2003, une recommandation européenne (98) fixait la fréquence minimale d'échantillonnage des aliments pour animaux à 20 par 100 000 tonnes produites. Pour la Belgique, par exemple, cela représente un total de 1 200 échantillons à prélever portant sur des matières premières et des aliments composés. Cette recommandation fixait également la fréquence minimale d'inspection des établissements à 10 par 100 000 tonnes produites, soit 600 inspections. La répartition des échantillons est établie en appliquant un facteur de pondération qui tient compte du risque encouru par type d'aliment (matières premières, aliments composés, prémélanges). Les aliments composés se retrouvent avec une pression d'échantillonnage supérieure à celle des matières premières. Les échantillons prélevés par les inspecteurs de l'Agence fédérale pour la sécurité de la chaîne alimentaire (AFSCA) visent tous les stades de la production, de la fabrication, les stades intermédiaires, la mise en circulation ainsi que l'utilisation des aliments pour animaux mis sur le marché belge, échangés sur le marché communautaire ou exportés vers les pays tiers en vue de détecter la présence éventuelle de protéines animales prohibées (59).

Les contaminations croisées doivent également être surveillées grâce à un plan d'échantillonnage aléatoire pour vérifier l'absence de ce type de contamination. La taille de l'échantillon collecté est imposée. Toutefois, la quantité par échantillon acheminé au laboratoire peut varier (76) et peut parfois poser des problèmes de représentativité par rapport aux lots d'aliments échantillonnés.

Lieu d'analyse et expression des résultats

En Belgique, les différents échantillons obtenus sont analysés par MO dans deux laboratoires accrédités pour la détection de PAT situés à Liège et à Tervuren. L'accréditation consiste en l'émission d'une attestation par une tierce partie qui est un organisme d'évaluation de la

conformité. Cette attestation apporte la démonstration formelle de la compétence de l'organisme à exécuter des tâches spécifiques d'évaluation de la conformité. Le laboratoire de Tervuren est également le Laboratoire national de référence (LNR) qui valide les résultats transmis par les autres laboratoires accrédités. Le Laboratoire de référence de l'Union européenne pour la détermination des protéines animales dans l'alimentation des animaux (EURL-AP) est situé au Centre wallon de recherches agronomiques à Gembloux (Belgique). Il est en activité depuis 2006 et encadre l'ensemble des différents LNR européens pour la détection des traces de farines animales. Il a également en charge la formation et la guidance technique des LNR. D'autre part, il organise des tests inter-laboratoires afin de standardiser les résultats de chaque LNR. Il joue également un rôle de contre-expertise à la demande du LNR ou de la Commission européenne.

Définitions de critères épidémiologiques et analytiques

Les tests inter-laboratoires permettent d'évaluer les résultats des laboratoires nationaux pour différents paramètres : exactitude, sensibilité (Se), spécificité (Sp), vrai résultat positif (VP), vrai résultat négatif (VN), faux résultat positif (FP), faux résultat négatif (FN), valeur prédictive d'un résultat positif, valeur prédictive d'un résultat négatif. L'exactitude est la qualité de l'accord entre l'estimation de la valeur mesurée et la valeur vraie (85). Les tests utilisés dans les LNR sont des méthodes de référence

et ont des valeurs de Se et de Sp définies légalement afin de minimiser au maximum les FP et les FN.

La confiance à accorder à un résultat positif ou à un résultat négatif d'un test de diagnostic ou de dépistage peut également être calculée : il s'agit soit de la valeur prédictive d'un résultat positif (VPP), soit de la valeur prédictive d'un résultat négatif (VPN). La VPN est la probabilité qu'un résultat négatif corresponde à un échantillon réellement indemne de contamination. Par analogie, la VPP est la probabilité qu'un résultat positif corresponde réellement à un échantillon contaminé.

La limite de détection (*limit of detection*, LOD) est la teneur minimale mesurée à partir de laquelle il est possible de déduire la présence de l'analyte avec une certitude statistique raisonnable (au moins 95 % pour les substances non autorisées). La limite de quantification (*limit of quantification*, LOQ) ou limite de détermination est la plus petite concentration d'analyte pour laquelle la méthode a été validée avec une exactitude et une précision spécifiées (87, 63). Une technique idéale doit avoir une LOD la plus basse possible afin de pouvoir également descendre la LOQ. La précision de la méthode englobe la reproductibilité et la répétabilité. La reproductibilité est le degré de concordance entre les résultats de tests indépendants, obtenus avec une fraction à analyser identique, dans des laboratoires différents, par des opérateurs différents ou avec des équipements différents. La répétabilité est le degré de concordance entre les résultats d'analyses indépendantes, obtenus avec une fraction à analyser identique, dans le même laboratoire, par

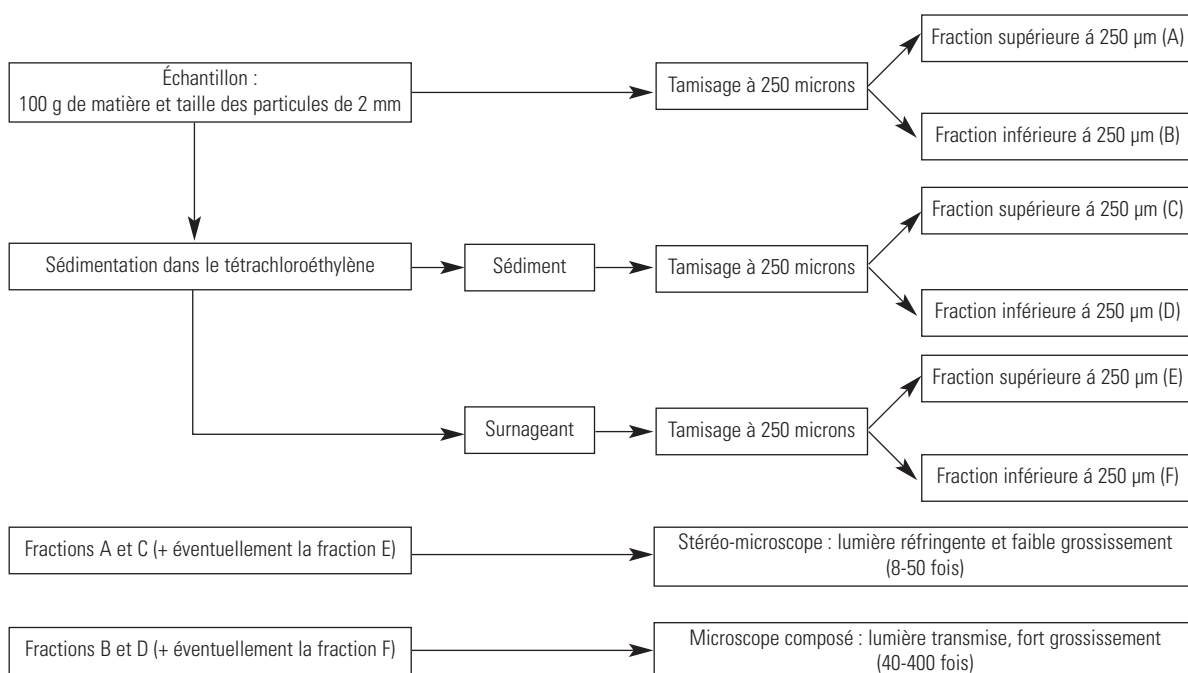


Fig. 1
Protocole d'analyse pour la microscopie optique (103)

Tableau II
Table de critères d'observation par microscopie optique de particules d'os issus de différentes espèces animales (39)

Espèce	Os	Lacunes	Critères visuels		
			Canules	Muscles	Autres
Mammifères	Couleur ^(a) blanche crème	Elliptiques	Visibles	Striés	Poils
Volailles	Plus sombre que ^(a) Forme courte et pointue	Sphériques	Visibles	Striés	Plumes
Poissons	Plus transparent que ^(a) Forme fusiforme à côtés parallèles	Globulaires	Non visibles	Striés	Écailles, arrêtes, bras

le même opérateur, avec le même équipement et à des intervalles de temps très courts (87).

Des techniques harmonisées sont nécessaires en Europe pour avoir des résultats comparables, notamment en termes d'exactitude, de précision, de Se et de Sp.

La méthode officielle

Le Règlement européen 152/2009/CE (101) L'échantillon impose comme unique méthode officielle la MO qui a été validée par une étude intercomparative effectuée en 2003 (39). Elle détecte les ingrédients d'origine animale grâce à une observation microscopique des caractéristiques spécifiques des particules résultantes de l'échantillon tel quel, de la fraction sédimentée et de la fraction surnageant après préparation des échantillons (Fig. 1). L'échantillon tel quel ou/et le flotat peuvent être observés dans une solution d'iodure de potassium, soluté donnant une coloration rouge-orange aux structures contenant des protéines (principalement les muscles). Elle nécessite un personnel ayant une bonne expérience pour la reconnaissance des particules caractéristiques (39). Cette méthode permet le discernement visuel entre des particules d'os d'origine d'animaux terrestres et de poisson. En effet, la forme des lacunes présentes et d'autres éléments discriminants tels que les écailles permettent de différencier ces deux groupes (Tableau II).

Différents protocoles pour la MO ont été appliqués, sous le couvert de la méthode européenne qui était valable jusqu'au 30 juin 2004 (Directive de la Commission n° 1998/88/CE) (90). Il s'agit notamment de la méthode française ou méthode à deux solvants (61), variante de la technique officielle. La procédure de sédimentation modifiée utilisait deux solvants différents et permettait de séparer le sédiment en deux. La partie intermédiaire était analysée avec cette méthode et dès lors, une portion plus faible du sédiment était analysée mais celle-ci était généralement plus concentrée en os.

À partir du 1^{er} juillet 2004, seule la technique officielle à un solvant a été autorisée pour le contrôle des farines animales

(101). Bien que donnant toutes deux des résultats satisfaisants, la méthode standard apporte une meilleure performance de détection que la méthode à deux solvants en présence de farine de poisson (110). Actuellement, seule la méthode officielle à un solvant est utilisée par les LNR et l'EURL-AP.

Le protocole décrit l'application de la MO tant pour une analyse qualitative que quantitative. D'un point de vue qualitatif, la méthode permet la détection de 0,1 % de FVO d'origine de mammifères et de farines de poisson. Des résultats récents ont montré une fiabilité limitée de la partie quantification du protocole (101, 106, 107).

Les autres méthodes disponibles

La détection des PAT peut être également envisagée par la recherche d'ADN ou de protéines spécifiques (voire de la PrP^{sc}). Les différentes techniques abordées ci-dessous ont été développées afin de suppléer la méthode officielle qui présente certaines limitations et de proposer un schéma de contrôle possible pour améliorer la Se et la Sp de la technique de détection des PAT dans l'alimentation du bétail en Belgique.

La chromatographie

Les techniques chromatographiques pour l'identification d'espèces et la détection de tissus animaux dans l'alimentation animale peuvent être classées en chromatographie gazeuse, chromatographie liquide et chromatographie liquide à haute performance (HPLC). En fonction de la technique de séparation des protéines, l'HPLC est subdivisée en HPLC échangeuse de cations, HPLC échangeuse d'anions, HPLC par exclusion de taille et HPLC en phase inverse. Les protéines myofibrillaires étudiées par HPLC par exclusion de taille permettent de différencier des protéines de bœuf, d'agneau, de veau, de porc, et de dinde à condition qu'il s'agisse d'échantillons

purs (86). Celle-ci permet de calculer le ratio entre deux dipeptides, la carnosine et l'ansérine. Ces dipeptides sont présents dans les muscles cardiaques, les reins et le foie et surtout en forte concentration dans les muscles squelettiques (5, 6, 78). En outre, il y a plus de carnosine que d'ansérine dans les protéines de mammifères que dans celles de volaille. L'identification des PAT jusqu'au niveau de l'espèce pourrait également être possible sur la base du ratio carnosine/ansérine/balenine (81).

Les méthodes de biologie moléculaire

Les méthodes immunologiques

Ansfield fut le premier à utiliser des techniques immunologiques dans l'analyse des aliments à destination du bétail (3, 4). Les méthodes immunologiques sont basées sur la reconnaissance d'antigènes (Ag) par des anticorps (Ac) spécifiques et leur mise en œuvre est généralement rapide et facile (2). Elles peuvent être qualitatives (présence/absence), semi-quantitatives ou quantitatives.

Une technique employant des microsphères couplées à des Ac et un cytomètre de flux (*flow microbead immunoassay*) a été mise au point (37). Cette technique permet de détecter des déterminants de PrP dans des extraits de FVO avec une grande spécificité et permet également de détecter la PrP^{sc} dans des FVO bovines contaminées par un cerveau infecté de tremblante à un ratio de poids égal à 50:1 (65). Bien que

ce genre de détection reste marginal, les méthodes immunologiques permettent néanmoins de déterminer si le TTL a bien été appliqué aux farines animales.

Les méthodes qualitatives sont basées sur le principe de l'immunodiffusion ou immunochromatographie à simple flux consistant à fixer un Ac spécifique sur l'Ag ciblé puis à révéler sa présence, soit avec un conjugué (anti-Ac dirigé contre le fragment Fc de l'Ac spécifique) fixé sur des microparticules d'or (*immunogold*), soit avec un conjugué sur lequel est fixée une enzyme (ex. peroxydase). Un test de migration rapide a été développé pour la détection de sous-produits de ruminants dans l'alimentation animale et les matières premières pour l'alimentation animale. Les Ag détectés sont des protéines de muscles de ruminants stables à haute température (>100 °C). La migration des Ac spécifiques de ces protéines et leur fixation sur une des deux bandes d'une tigette donne le signal visuel de leur présence. Un complexe immun présent dans le réactif migre également sur la tigette et se fixe sur une bande contrôle placée au-dessus de la bande de résultat, validant le bon fonctionnement du test.

Un test spécifique détectant des protéines de ruminants dans l'alimentation animale a été développé (*Reveal® for ruminant in feed*). Ce test est très spécifique et, selon la notice du fabricant (Neogen Corporation, Lansing, MI), nécessite 20 minutes pour obtenir un résultat. Un second test de la même firme appelé *Agri-screen Ruminant MBM*, détecte la présence de FVO de ruminants dans des FVO

Tableau III

Différences entre le FeedChek® et le Reveal® concernant la détection de protéines animales dans l'alimentation des animaux (70)

Paramètre		Reveal®	FeedChek®
Protéines détectées		Ruminants	Animaux terrestres
Poids de l'échantillon (g)		10	10
Présentation de la tigette	Nombre de lignes de contrôle	1	1
	Nombre de lignes de résultat	1	2
Réaction colorimétrique facilement interprétable		Non	Non
Précision de détection	à 0,025 % BMBM	Non atteint	Non atteint
	à 0,05 % BMBM	Non atteint	Non atteint
	à 0,1 % BMBM	Non atteint	Atteint
	à 0,25 % BMBM	Non atteint	
	à 0,5 % BMBM	Non atteint	
	à 1 % BMBM	Non atteint	
Précision de détection globale		Insuffisant	Suffisant
Sensibilité		100 %	62 %-66 %
Faux-positif (1-spécificité)		0 %	34 %-38 %
Temps d'attente avant lecture		>10 min (20 min)	3 min
Fenêtre de lecture		–	3 à 5 min
Archivage électronique		Non	Non

BMBM : farines de viandes et d'os d'origine bovine (*bovine meat and bone meal*)

pour non-ruminants. Le seuil de détection du premier test se situe à 1 % de protéines de ruminants dans les matières premières (51). Le second test est annoncé avec un seuil de détection de 5 % de FVO, raison pour laquelle il ne sera pas pris en compte. Un troisième test existe, le FeedChek® vendu comme un test spécifique de détection des protéines d'animaux terrestres (mammifères et oiseaux) (Strategics Diagnostics Inc.) (Tableaux III et IV). Les méthodes (semi-) quantitatives reposent sur l'utilisation de tests immuno-enzymatiques (*enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA), subdivisés en ELISA indirects, ELISA de compétition et ELISA sandwich. Ces méthodes détectent des protéines spécifiques à des seuils très bas (ng/ml) et en un minimum de temps (112). Elles sont utilisées pour le contrôle du TTL, de la présence de matériel issu du système nerveux central et de la détermination d'espèces dans des matières premières (21). Elles sont développées pour identifier l'espèce d'origine à partir de matières premières carnées mais beaucoup ne sont pas utilisables sur la matrice « viandes traitées à forte température » car le TTL entraîne un changement de conformation irréversible des protéines.

Dans les techniques ELISA sandwich, les Ac de capture sont soit polyclonaux (Acp), reconnaissant différents épitopes d'un Ag donné. Les Ac peuvent également être dits monoclonaux (Acm), c'est-à-dire reconnaissant un seul type d'épitope d'un Ag donné (22). La cible (Ag) peut être une protéine musculaire (22) comme la troponine I (TnI), protéine myofibrillaire régulatrice montrant un grand potentiel en tant que marqueur protéique

thermostable pour l'identification d'espèces dans plusieurs sortes de viandes traitées thermiquement (19, 21). La principale fonction de cette troponine dans l'organisme est l'inhibition de l'ATPase actomyosine. Ses épitopes peuvent être reconnus par différents Acm, même après un traitement thermique moins drastique que celui décrit dans la législation européenne (ici, 132 °C/2 bars, pendant 2 heures) (21). Les Acm anti-TnI ont été mis au point (Tableau V) et appartiennent à la classe des immunoglobulines G (IgG).

Les tissus musculaires contenant de la TnI, traités dans l'alimentation animale peuvent être également détectés par des tests ELISA indirects où les extraits à tester sont adsorbés sur des plaques. Ces tests font intervenir des Acm (7A12, 8A12 et 2A8). La limite de détection des tests pour des protéines de ruminants et mammifères oscille entre 0,3 % et 2 % (21, 46).

Un ELISA indirect utilisant l'Acm 2F8 a également été développé pour détecter des PAT traités à haute température (46).

Certaines protéines originelles isolées du muscle lisse, les h-caldesmon sont prometteuses pour développer un test analytique pour la détection de FVO dans l'alimentation animale. Parmi tous les Acm testés, le 5E12 a été identifié comme le meilleur candidat car il est capable de différencier les FVO de la majeure partie des ingrédients utilisés dans la production commerciale d'aliments pour

Tableau IV
Table d'interprétation des résultats obtenus à partir du FeedChek® et du Reveal® dans l'alimentation animale
(70)

Test	Résultats des lignes			Interprétations
	Contrôle (a)	Test 1 (b)	Test 2 (c)	
Reveal® in feed	+	+	Néant	Présence de RMBM
	+	-	Néant	Absence de RMBM
	-	+	Néant	Test non interprétable
FeedChek®	+	-	-	Absence de PM et/ou PA dans FVO<0,1 %
	+	+	-	Présence de PM et/ou PA dans FVO>0,1 %
	+	-	+	Présence de PM et/ou PA dans FVO≥0,1 %
	+	+	+	Présence de PM et/ou PA dans FVO≥0,1 %
	-	-	-	Test non interprétable
	-	+	-	Test non interprétable
	-	-	+	Test non interprétable
	-	+	+	Test non interprétable

(a) Ligne de contrôle : elle permet de valider la bonne fonctionnalité du test. Elle apparaît quand le phénomène de migration (Ag recherchés) a bien fonctionné
 (b) Ligne de test 1 : elle apparaît lorsque l'antigène recherché est présent dans l'échantillon analysé
 (c) Ligne de test 2 : elle apparaît lorsque l'antigène recherché est présent dans l'échantillon analysé

RMBM : farines de viandes et d'os d'origine de ruminants (*ruminant meat and bone meal*)
 FVO : farines de viandes et d'os
 PM : protéines de mammifères
 PA : protéines animales

Tableau V

Liste des anticorps monoclonaux anti-troponine utilisés pour la détection immunologique des protéines animales d'espèces différentes dans l'alimentation du bétail (21, 22)

Groupe	Acm anti-Tnl	Isotype d'Ac	Spécificité d'espèces										Affinité envers l'espèce cible
			Bovins	Ovin	Cervidés	Porc	Équin	Poulet	Dinde	Canard	Oie	Poisson-chat	
I	7F7	IgG1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++++
	1F9	IgG1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++++
	2G3	IgG1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+++
II	7A12	IgG2b	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	++
	8A12	IgG1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
III	2A8	IgG1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	ND
	3E12	IgG	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	ND
IV	1B2	IgG	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	ND
	5G9	IgG	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	ND

Les matrices utilisées lors des différentes études ont toutes subi un traitement thermique à 132 °C, 2 bars, pendant 2 heures

I : groupe regroupant les anticorps (Ac) monoclonaux ayant une grande affinité avec des troponines (Tnl) d'espèces fort différentes (porc, bovins, ovin, équin, cervidés, poulet, dinde, canard, oie, autruche et poisson-chat)

II : groupe d'Ac monoclonaux ne réagissant qu'avec des Tnl d'espèces de mammifères uniquement (porc, bovins, ovin, équin, cervidés)

III : groupe d'Ac monoclonaux ne reconnaissant spécifiquement que les Tnl d'espèces ruminantes sauvages et domestiques (bovins, ovin, cervidés)

IV : groupe d'Ac monoclonaux ne reconnaissant que les Tnl de ruminants domestiques (bovins et ovin)

+: détection

-: non-détection

animaux et de s'associer fortement sur les muscles bovins traités thermiquement. Le seuil de détection pour cet Acm est prétendu être de l'ordre de 0,05 % de FVO dans l'alimentation animale (47).

Des Acm spécifiques du muscle porcin ont également été développés avec succès pour la détection de protéines de porc dans les viandes et les produits de viandes soumis à une forte température (20). Cette détection est à replacer dans le cadre du respect de la législation communautaire et, en particulier, le respect de l'interdiction de toute forme de cannibalisme. Aucune réaction croisée n'a été mise en évidence entre la détection de protéine musculaire squelettique de porc et le sang, le lait ou la gélatine (18). Les Ac sélectionnés doivent être capables de reconnaître des épitopes de la Tnl traitée ou non par un TTL, c'est-à-dire de la Tnl présente autant dans les matières premières que dans les muscles ayant subi un TTL (21). À l'instar de la PCR, l'avantage principal de ces protéines détectées par les tests ELISA est qu'elles ne sont pas présentes dans toutes les cellules de l'espèce ciblée. Par exemple, la h-caldesmon est absente du muscle cardiaque et des muscles squelettiques alors qu'elle est présente dans les muscles lisses (47).

La technique PCR

L'amplification en chaîne par polymérase ou plus communément notée PCR pour *polymerase chain reaction* est une technique de réplification ciblée *in vitro* permettant d'obtenir à partir d'un échantillon complexe et peu

abondant, d'importantes quantités d'un fragment d'ADN spécifique et de longueur définie. Des millions de copies peuvent ainsi être produits en quelques heures grâce à une succession de réactions de réplification d'une matrice double brin d'ADN. Deux amorces oligonucléotidiques dont les extrémités 3-prime pointent l'une vers l'autre sont utilisées pour chaque réaction et elles délimitent alors le fragment d'ADN à amplifier (amplicon). Au lieu de n'utiliser que la matrice originelle comme base, tous les produits obtenus sont utilisés comme matrice pour la réaction suivante. L'amplification obtenue est alors exponentielle au lieu d'être linéaire et peut être couplée à un signal lumineux permettant la détection et la quantification des copies d'amplicon. La Taq polymérase est une polymérase résistante aux températures élevées et elle permet ainsi une automatisation de la technique (14, 54).

La RT-PCR (en anglais, *reverse transcriptase PCR*) est une PCR classique réalisée sur un ADN complémentaire (ou ADNc), qui est une copie obtenue par la transcription inverse d'un brin d'acide ribonucléique (ARN). Mais les ARN peuvent être très facilement dégradés et être contaminés par de l'ADN génomique. Cette technique n'est donc pas à envisager dans la détection de traces de protéines.

La PCR en temps réel (*real time PCR*), notée également Q-PCR lorsqu'elle est quantitative, consiste à mesurer la quantité d'ADN polymérisé à chaque cycle grâce à un marqueur fluorescent (9, 38). Son principe permet de faire

des mesures quantitatives des copies de l'amplicon mais elle nécessite des thermocycleurs particuliers. La Q-PCR est une technique prise en considération pour la quantification des traces de farines animales. L'utilisation de sondes d'hybridation pour la Q-PCR est systématique. Une mesure de fluorescence est obtenue et permet de donner une valeur numérique (Ct) définissant le nombre de cycles nécessaires pour atteindre un niveau défini de fluorescence relative permettant la détection du signal. Ce Ct renseigne sur le processus d'amplification permettant la comparaison de différents échantillons afin d'établir les résultats définitifs. La Q-PCR utilise des amplicons de petite taille, présents souvent en grande quantité dans les PAT traitées à haute température (43).

La PCR multiplexe est un protocole destiné à amplifier plus d'un amplicon à la fois, généralement en ajoutant un couple d'amorces spécifiques. La PCR multiplexe peut se faire en temps réel avec une sonde spécifique couplée à un fluorophore (24). Toutefois, son aspect quantitatif ne fait pas l'unanimité.

Après amplification d'une région définie, la RFLP-PCR (technique de polymorphisme de longueur des fragments de restriction, RFLP) permet d'obtenir des marqueurs (24). En faisant agir plusieurs enzymes de restriction, l'étude du polymorphisme se situe à autant de sites particuliers qui se répètent tout au long de la molécule d'ADN à partir des produits PCR et évite l'étape d'hybridation et l'utilisation de sonde radioactive. Le produit PCR digéré par une ou plusieurs enzymes de restriction est simplement mis à migrer dans un gel d'agarose et le polymorphisme de la position et du nombre de bandes est visualisé par une réaction colorée (bromure d'éthidium).

Différentes PCR ont été mises au point. Elles utilisent des protocoles d'extraction et des cibles différentes ce qui rend complexe leur comparaison.

Les méthodes spectroscopiques

Il existe d'autres techniques comme les méthodes spectroscopiques permettant d'analyser des échantillons en fonction du spectre que donne l'ensemble des molécules constitutives. Elles sont non invasives et non destructrices. Les spectres ainsi obtenus contiennent des informations sur les substrats étudiés. Cependant, l'obtention de ces informations n'est pas immédiate car un traitement mathématique des données brutes est souvent nécessaire. La chimiométrie, qui est l'ensemble des méthodes statistiques et graphiques, permet d'améliorer la compréhension d'informations obtenues dans le domaine de la chimie. Elle s'applique à toutes les étapes de l'analyse, depuis la première conception de l'expérience jusqu'à l'interprétation des données.

Caméra proche infrarouge

Cette technique permet d'analyser un échantillon en utilisant une caméra qui prendra un certain nombre de clichés à différentes longueurs d'onde et dont les spectres proche infrarouge (IR) issus de tous les points de mesure seront analysés afin de détecter la présence de farine animale. Les fondements sont donc similaires à la microscopie proche infrarouge (NIRM) mais la quantité d'échantillons pouvant être traitée en une journée est plus importante et pourrait être employée comme méthode de dépistage (35).

Un résumé comparatif des différentes techniques de détection des PAT est repris dans le Tableau VI. Il inclut des résultats issus d'études inter-laboratoires.

Discussion

Une méthode idéale de détection doit être non destructive, permettant ainsi la contre-analyse et l'analyse par d'autres méthodes de ce même sous-échantillon. L'échantillon doit être de faible poids (au moins 5 g) mais doit également être représentatif du produit à analyser (97). L'hétérogénéité du produit à analyser rend nécessaire un prélèvement aléatoire de différentes portions du produit afin de constituer un pré-échantillon représentatif duquel est extrait l'échantillon réel servant à l'analyse. Améliorer la préparation de l'échantillon et/ou l'extraction d'une plus grande quantité de matériel peut être une solution permettant une meilleure analyse mais cela ne permet pas la conservation des échantillons à long terme (40). Les échantillons sont issus de deux types d'aliments : les matières premières et les aliments composés qui sont tous les deux sujets aux contaminations croisées. Les aliments composés peuvent en outre contenir légalement des FVO (Tableau I).

La détection de traces de FVO est une première étape. Vient ensuite l'étape 2 qui permet de déterminer si le TTL a bien été respecté. La troisième étape correspond à la détermination de l'espèce(s) ce qui permet de valider si l'échantillon est conforme ou non selon la législation en vigueur quant à la présence de PAT.

L'étape 1 est la clé de voûte du diagnostic des FVO. Le test utilisé doit pouvoir détecter tout VP (avoir une Se proche de 100 % et minimiser les FN) afin d'éviter les risques de contamination de la chaîne de production d'aliments pour bétail. La performance globale de détection qualitative pour la MO est jugée excellente pour 68 % des 25 LNR évalués dans le cadre d'une étude menée par l'EURL-AP. Les résultats de cette étude mettent également en évidence l'importance de réaliser un dépistage sur la base de l'observation d'un nombre minimum de particules avant de

conclure quant à la présence ou l'absence de constituants animaux dans l'alimentation du bétail (107). Les résultats obtenus à partir des tigettes chromatographiques sont pour l'instant décevants. Les fenêtres de lecture ne sont pas fiables et trop étroites, l'enregistrement numérique de la preuve est impossible, elles doivent être utilisées par un analyste expérimenté, et les FN varient en fonction de l'analyte utilisé. Leur faible Sp (66 %) ainsi que l'existence

de FP sont autant de points négatifs à mettre en avant. Par ailleurs, bien qu'un traitement thermique de la matrice (125 °C à 131 °C pendant 5 min, sur une durée totale de 30 min) améliore les performances du test, ce barème n'est pas conforme aux exigences européennes (70).

Pour augmenter la Se du test de détection des techniques immunologiques, une double précipitation précédée d'une

Tableau VI

Comparatif des principales techniques de détection de la présence de protéines animales transformées dans l'alimentation du bétail en Europe (7, 10, 12, 28, 48, 49, 55, 56, 62, 66-69, 71, 75, 80, 108, 109, 119)

Test	Type	TTL matrice	Espèces détectées	LOD (% de FVO dans l'alimentation animale)	Taille amplicon
MO	–	TTL	MMBM, FM	0,1 %	–
HPLC	Dipeptides : ansérine et carnosine	120 °C durant 20 min	MM	0,5 %	–
Tigettes ICA	Reveal test®		BV-RMT	2 %	–
	FeedChek test®	127 à 134 °C	BV-RMT MM	0,1 %	–
	Étude comparative			0,5 %	–
EIA sandwich	Acp (IgG)	138 °C durant 20 min ou 130 °C durant 30 min à 2,7 bars	OV	–	–
			RMT, PC	–	–
	Acm	132 °C durant 2 h à 2 bars ou 130 °C durant 2 h	RMT, BV+OV	0,2 %	–
			ME	0,3-2 %	
			BV + SgBV	0,05-0,5 %	
		TTL	0,05 %		
		mIBV			
PCR	Validation interlaboratoire	133 °C durant 33 min et autoclavage ou 125-131 °C durant 30 min ou	BMBM, LM, PMBM	0,1 %	271 bp,
			RMT	0,1 %	225 bp,
	Kit légal pour extraction de l'ADN	133 °C durant 20 min à 3 bars	BV, OV, PC, PLT	0,125 %	68 bp,
			CP	0,125 % BMBM	231 bp,
			RMT, PC, PLT	0,01-0,001 %	271, 40, 147 bp
			BV	0,5 %	181 bp
			OV, PC, VOL	0,3 à 1 %	
		Max < 2 %			
Q-PCR	Étude interlaboratoire	133 °C durant 20 min à 3 bars ou 133 °C durant 40 min à 2 bars ou 134 °C durant 3 à 20 min ou 130 °C durant 20 min	RMBM, PMBM, CMBM	0,1 % 0,01 % 0,05 %	271 bp 111-145 bp 57-60 bp
Multiplex PCR	–		RMT, LMBM, CP, mélange de dinde, PC et BV	0,25 %	–
RFLP-PCR	–	130 °C durant 20 min	RMT, PC, CV	0,5 %	359 bp
NIRM-PLS	–	TTL	Toutes espèces	0,05 %	–
NIRS	–	TTL	Toutes espèces	–	–
NIR camera	–	TTL	Toutes espèces	0,1 %	–

Ag : antigène
BMBM : farines de viande et d'os d'origine bovine
bp : paires de bases
BV : bovins
CC : contamination croisée
CP : caprin
EIA : test immunologique utilisant la liaison à un enzyme
FM : farines de poisson
FP : faux positif
FN : faux négatif
HPLC : chromatographie liquide à haute performance
ICA : test d'immunochromatographie

LM : farine de mouton
LOD : limite de détection
MBM : farines de viande et d'os
ME : multi-espèces
mIBV : muscle lisse de bovins
MM : mammifères
MMBM : farines de viandes et d'os d'origine de mammifères (*mammalian meat and bone meal*)
NE : norme européenne
NIRM : microscopie proche infrarouge (*near infrared microscopy*)
OV : ovin

PA : pression atmosphérique
PC : porc
PLT : poulet
PMBM : farines de viande et d'os d'origine porcine
RMT : ruminants (domestiques et sauvages)
Se : sensibilité
SgBV : sang de bovins
Sp : spécificité
TTL : traitement thermique légal
VOL : volaille

étape de préchauffage avant l'étape de détection peut être réalisée afin de minorer les FN qui sont élevés en présence de graisse ou d'huile. Une recherche est alors ciblée sur la fraction de protéine thermostable grâce à l'utilisation d'Ac thermorésistants (3, 4). Toutefois, dans les techniques immunologiques, le traitement thermique appliqué est insuffisant pour répondre aux exigences européennes en la matière (21, 22). La Se peut également être améliorée par l'emploi d'un test ELISA détectant des TnI spécifiques du muscle bovin (Tableau V) ou un ELISA basé sur les protéines h-caldesmon. Le principe basé sur la détection des TnI reste toutefois intéressant à développer dans des conditions de TTL conformes aux normes européennes. La matrice du prélèvement doit aussi être prise en compte. L'utilisation de différentes concentrations en graisses de viande de porc et viande de bœuf a montré que le signal de détection obtenu pour la détection de TnI par un test ELISA sandwich ne différait pas de manière significative. Une technique de préparation de l'échantillon avant de pratiquer un test ELISA permet d'extraire des quantités similaires de TnI quel que soit le pourcentage de graisses présent dans la matrice (79). Les principaux inconvénients des techniques immunologiques de type ELISA sandwich sont l'interférence avec les matrices alimentaires comme le lait. Par ailleurs, un aliment composé pourrait renfermer de très faibles concentrations de FVO ou de farines de poisson (40). Ces techniques immunologiques peuvent servir à affiner la source des FVO (tissu-mère) en troisième intention mais ne semblent pas efficaces comme premier test de dépistage.

L'amélioration de la Se peut passer par l'utilisation des méthodes PCR en jouant sur la taille de l'amplicon sélectionné. Selon les études scientifiques réalisées, sa taille peut varier de 68 à 359 paires de bases (bp). Celle-ci peut influencer proportionnellement le signal du test PCR. Le nombre de cycles nécessaires passe, par exemple, de 16 cycles pour une sonde de 68 bp à 39 cycles pour une de 174 bp (38). Des sondes d'une longueur supérieure à 174 bp ne donnent plus de signal mais elles servent surtout à détecter les viandes fraîches, cuites ou en conserves et non à détecter des FVO ayant subi un TTL (11, 13, 23, 38, 50, 52, 53, 84, 113). Ces résultats sont en accord avec d'autres études (36) démontrant que les amplicons de 147 bp peuvent être utilisés pour détecter la présence d'ADN mitochondrial bovin dans des échantillons de FVO traitées selon la législation européenne en vigueur. Le nombre élevé de FN et FP trouvés dans une étude comparative (40) s'explique respectivement par la grande taille de la sonde (271 bp) et par la présence possible d'une source autorisée d'ADN bovin (lait, sang), autre que les FVO ajoutées à l'alimentation animale. Une étude récente montre que l'utilisation de sondes d'environ 100 bp et d'une Q-PCR sont deux pré-requis indispensables pour obtenir une augmentation de la Se (76). La Se de la PCR peut également être améliorée en faisant varier le nombre de

cycles nécessaires pour la détection. Des résultats obtenus concernant le Ct pour un même échantillon (même type de matériel, sur la même ligne de production) coïncident, même si les conditions de traitement thermique ne sont pas identiques : pour un même type de matériel, le Ct diminue proportionnellement avec la température appliquée. Le point de départ de la zone d'amplification exponentielle dépend clairement du traitement à haute température subi par l'échantillon analysé : plus la température est élevée, plus le signal apparaît tardivement et plus grande est la valeur du Ct (39). Une limitation majeure de la méthode PCR est qu'elle n'est pas capable de différencier l'ADN provenant de produits non autorisés de l'ADN des produits autorisés (par exemple produits d'œufs, lait, graisse animale). Cela signifie qu'un signal PCR peut être interprété erronément comme une preuve de la présence de PAT non autorisées. Sa limite principale réside dans le coût de l'appareillage et la durée incompressible de l'analyse qui limite le nombre d'analyses possibles par jour (une remarque identique peut être émise pour la Multiplex PCR).

Tout comme les techniques ELISA sandwich, la PCR subit également l'interférence avec les matrices alimentaires comme le lait. La présence de FP diminue la Sp du test utilisé. Ces FP sont moins problématiques car de nouvelles analyses peuvent être effectuées sur les échantillons positifs afin de confirmer ou infirmer les premiers résultats. Les FP ont toutefois une influence sur la confiance du consommateur concernant la sécurité de la chaîne alimentaire et ils augmentent le coût global des analyses. Par ailleurs, l'utilisation d'un test en série augmente la Sp globale de la détection. La Sp de la PCR est fortement réduite par le TTL. L'hybridation de sondes, avec des conditions de cycles appropriées, est également un moyen d'augmenter la Sp du test PCR.

Une technique idéale doit également avoir une LOD la plus faible possible. Cette LOD est utile pour la méthode servant de premier filtre quant à l'analyse des échantillons. La MO est actuellement utilisée comme technique de référence et possède une LOD estimée inférieure à 0,1 % de fragments d'os. Ce seuil doit au moins être atteint par toute autre technique revendiquant la dénomination de méthode officielle. Celle-ci combinée à l'analyse NIR, tout comme la MO, peut détecter jusqu'à 0,05 % de FVO dans l'alimentation animale (8). La LOD des techniques immunologiques de type ELISA sandwich avoisine les 0,5 % de FVO. Elles permettent une détection directe des protéines, et ne nécessitent pas la présence de fragments d'os. En plus, leur utilisation est possible sur les échantillons liquides. La LOD de la PCR est inférieure ou égale à 0,1 % de FVO (38). D'autres études inter-laboratoires ont été menées en 2007 par l'EURL-AP afin de juger de la valeur qualitative (107) et quantitative (106) de la détection de la MO par les LNR.

La précision de la méthode est aussi importante. Cette précision englobe la répétabilité et la reproductibilité. Les résultats obtenus pour la quantification montrent d'une part, que la reproductibilité n'est pas bonne malgré une répétabilité acceptable et, d'autre part, une surestimation systématique (106).

Les farines de poisson sont autorisées dans l'alimentation des espèces de non-ruminants comme le porc et la volaille (92). Elles sont interdites dans l'alimentation des ruminants (sauf ruminants non sevrés [102]). Une comparaison européenne de la Se obtenue en MO pour l'analyse d'un échantillon contaminé (0,1 % FVO + 5 % farines de poisson) montre que depuis 2003, la Se augmente pour atteindre un maximum en 2006 passant de 45 % à 87,9 % avec des intervalles de confiance à 95 % convenables et ne se chevauchant pas (105). Cette Se est cependant inférieure à celle enregistrée lors d'une étude réalisée par l'Organisation internationale des farines de poissons et des huiles de poissons (IFFO) en 2003 (103). Cette étude prend en compte un nombre plus restreint de laboratoires très expérimentés et qui ont travaillé avec un protocole plus strict que celui énoncé dans la Directive européenne 2009/152/CE (101). En 2006, la capacité de détecter les farines de poisson a été altérée par des déclarations de FP uniquement. Pour certains résultats FP, l'explication est peut-être à rechercher dans une contamination croisée au niveau du laboratoire (105). Des contaminations au niveau du laboratoire peuvent entraîner des échecs de détection, voire des niveaux de résultats faibles en Se et Sp. Elles peuvent être évitées en utilisant les hottes à flux laminaire et des locaux séparés (selon la norme ISO 22174). Une étude inter-laboratoires faite en 2006 montre une très forte amélioration de Se et Sp des techniques PCR utilisées dans les laboratoires de référence (76).

Un laboratoire doit également pouvoir effectuer un maximum d'analyses en un minimum de temps avec une objectivité à toute épreuve afin de répondre aux exigences du cadre législatif. Les techniques immunologiques de type ELISA sandwich pourraient à terme, si leur sensibilité s'améliore, davantage se prêter à l'analyse d'un grand nombre d'échantillons par automatisation, réduisant ainsi le temps d'analyse. Elles sont rapides et de faible coût ; elles permettent un dépistage efficace. Pour la PCR par contre, l'automatisation n'est pas encore possible. Pour la microscopie, l'objectivité de la lecture peut être améliorée en utilisant des techniques de microscopie NIR. Ainsi, par exemple, les résultats obtenus avec la technique NIRM sont équivalents à ceux obtenus en MO avec les avantages supplémentaires de l'objectivité et de la possibilité d'automatisation. La caméra NIR, une autre technique de microscopie proche infrarouge, permet une acquisition beaucoup plus rapide des spectres de particules et augmente fortement le nombre d'échantillons analysés par unité de temps par rapport à la méthode NIRM. La

diminution des coûts salariaux et l'augmentation du nombre d'échantillons analysés se traduisent par une rentabilité accrue de la caméra NIR, malgré son coût initial d'investissement important. Cette technique pourrait être utilisée dans les usines de production, afin d'agir plus en amont et de retirer les lots de matières premières contaminées. Ceux-ci seraient alors détruits ou réorientés, comme par exemple les matières premières contaminées par des farines de poisson qui seraient réorientées vers l'alimentation pour non-ruminants ou ruminants non sevrés (102). Des désavantages pour cette technique existent néanmoins. La méthode caméra NIR actuelle ne peut analyser qu'un champ d'une épaisseur égale à une particule. Passer à la détection d'une tonne d'aliments prendrait beaucoup trop de temps. Un échantillonnage représentatif de l'aliment à analyser serait donc obligatoire. La difficulté résiderait également dans l'analyse des spectres obtenus. Avec la NIRM, le spectre de chaque type d'aliments existe (matières premières, aliments composés, pré-mélanges). Lors de l'analyse par microscopie NIR, le spectre est enregistré et conservé dans une base de données.

L'étape 2 est de déterminer si le TTL a bien été effectué selon les normes en vigueur au sein de l'Union européenne. Ce TTL entraîne l'hydrolyse des protéines (45, 64) et la chaleur sèche détruit les épitopes (à 147 °C pour du matériel d'origine ovine, à 152 °C pour du matériel d'origine porcine, et à plus de 160 °C pour du matériel d'origine bovine [4]). L'emploi de techniques immunologiques en début de détection est à même de vérifier cela. Les Ac utilisés pour ce genre de test sont dirigés contre des protéines stables à haute température (111). La méthode ELISA est une méthode fiable pour la surveillance du TTL (96, 111).

Les méthodes Q-PCR développées pour la détection des FVO dans les aliments à destination animale fonctionnent également lorsque les FVO ont été traités à un TTL (38). La Se reste quand même élevée pour ce type de détection, même après un traitement thermique plus élevé (141 °C) sous une humidité saturée. Les méthodes Q-PCR pourraient être utilisées comme méthode de confirmation. De plus, une étude récente utilisant la Q-PCR démontre que le poids de l'échantillon (de 100 mg à 40 g) n'influence aucunement la Se du test pour la détection de 0,1 % de FVO d'origine bovine pour autant qu'une étape de mélange ou/et de broyage soit incluse (76).

Enfin lors de l'étape 3, une technique idéale doit être capable de confirmer l'espèce d'origine et le tissu de provenance afin de vérifier la légalité de cette présence. Les techniques immunologiques de type ELISA sandwich identifient les Ag de protéines animales spécifiques d'espèces. En ce qui concerne la PCR, les sondes habituellement choisies pour ce type d'échantillon (souvent fortement dégradé) sont des sondes présentes en

grand nombre dans le génome telles que l'ADN mitochondrial, les séquences répétitives dans le génome telles que les « *mammalian-wide interspersed repeats* » (MIRs) de l'ADN satellite (16) ou des courts ou longs éléments nucléotidiques intercalés (SINEs et LINEs) (60, 83). Le choix d'une sonde sélectionnée sur deux gènes (tARN^{lys}/ATP8) où la succession est typique de l'espèce animale (84) et d'une sonde correspondant à une région qui est présente en plusieurs copies dans les cellules (ADN mitochondrial) a prouvé son intérêt. Des combinaisons de différentes sondes (*primers*) ont été définies et testées sur des matrices bovine et porcine mais des combinaisons d'autres espèces (poulet, mouton et poisson) sont encore en développement (38).

Bien que les méthodes basées sur la PCR soient assez spécifiques et sensibles pour déterminer la nature de l'échantillon, elles ne sont en général pas capables de faire la distinction entre différents tissus de la même espèce (21), à la différence des tests immunologiques. Les résultats peuvent varier en fonction d'un grand nombre de paramètres, tels que l'origine du muscle et sa part dans une farine animale, les pourcentages de graisses, la maturité de la viande et les procédés technologiques employés. Ainsi, les techniques d'identification des espèces animales, quelles qu'elles soient (analyses de protéines, analyse de l'ADN), ne fournissent très généralement que des résultats semi-quantitatifs ou qualitatifs. Pour que des méthodes immunologiques de recherche d'espèces soient quantitatives, il faut que la composition, le conditionnement et les traitements des produits soient parfaitement définis mais ce n'est pas le cas dans l'alimentation animale.

Quand le diagnostic de positivité de l'échantillon est posé et que l'espèce et le tissu de provenance sont établis avec certitude, il reste à retrouver le produit originel pour retrouver les autres contaminations possibles. Dans ce contexte, la description des échantillons (composition précise) et les informations concernant la traçabilité et/ou la préparation des échantillons s'avèrent primordiales (14, 23, 52).

L'utilisation conjointe de différentes méthodes de détection permet de combiner les avantages de chacune afin d'arriver à une Se et une Sp globales optimales.

Pour les techniques spectrophotométriques, la détection en continu sur tapis roulant d'un échantillon représentatif du lot de matières premières et/ou des aliments composés par spectrophotométrie pourrait être une solution, permettant d'éliminer les lots d'aliments contaminés par des protéines animales et ainsi de diminuer le coût de revient des analyses. Un lot correspond à une formule particulière produite par un fabricant sur une période de 24 h. Sa taille n'est donc pas définie (59). Ce premier filtre serait suivi d'un second, portant l'analyse sur un mélange

d'échantillons plutôt que sur l'analyse individuelle de ceux-ci. Cela permettrait de diminuer le volume à échantillonner. Ensuite, seuls les lots positifs seraient confirmés avec des techniques plus spécifiques comme les tests immunologiques et/ou la PCR, afin de déterminer plus précisément si des PAT sont présentes et de déterminer l'espèce et le tissu d'origine.

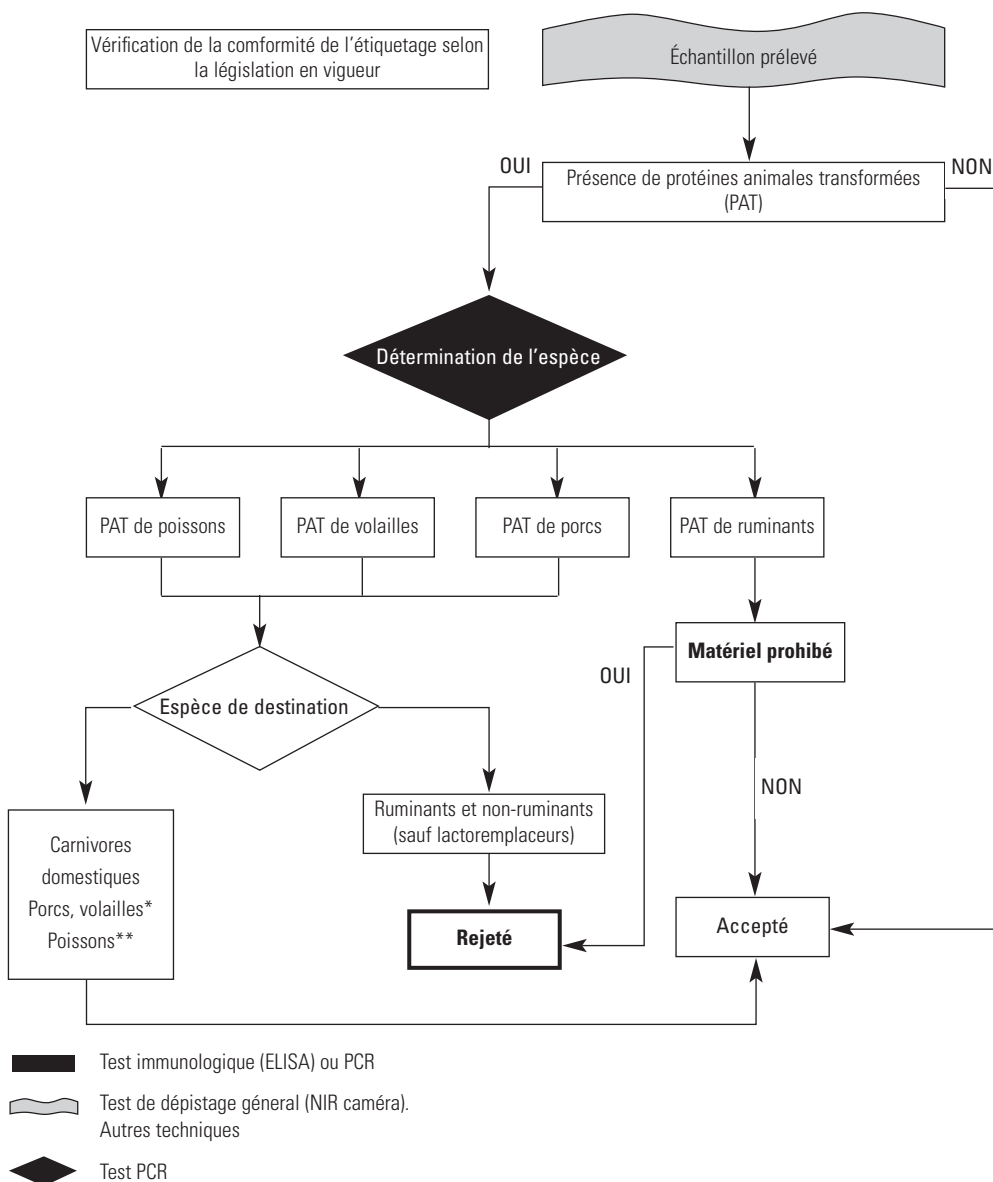
La combinaison de plusieurs techniques peut être évaluée de manière qualitative. Pour un même test, en augmentant la LOQ, la Sp augmente au détriment de la Se. L'intérêt d'utiliser une séquence de tests pour optimiser les valeurs de Se et de Sp s'avère primordial : l'utilisation de tests en série augmente la Sp tandis que l'utilisation de tests en parallèle augmente la Se globale de la détection. Actuellement, il n'est pas possible de définir une LOQ à cause de l'insuffisance d'études conduites concernant la performance de la MO comme méthode quantitative (32).

La technique de détection optimale des PAT doit pouvoir répondre à différentes questions : les protéines retrouvées dans l'alimentation du bétail sont-elles des protéines d'origine animale prohibées ? Si oui, en quelle quantité ? Un schéma évènementiel est proposé à la Figure 2. Il est ensuite nécessaire de vérifier également si le TTL et le marquage au GTH obligatoire des matières premières ont bien été effectués conformément à la législation européenne en vigueur. Le GTH est détectable en utilisant la technique du spectromètre de masse couplé à une chromatographie gazeuse.

Il reste à mentionner dans la législation européenne qu'une tolérance existe dans certaines conditions, énumérées dans l'annexe IV du règlement européen 999/2001/CE (94). Elle concerne les PAT retrouvées dans l'alimentation des animaux d'élevage. Elle stipule que l'utilisation des tubercules et des racines comestibles contenant ces produits, après détection de spicules osseux, peut être autorisée par les États membres, sous réserve qu'une analyse de risque soit favorable. L'analyse de risque doit tenir compte, au minimum, de l'ampleur de la contamination et de sa source éventuelle, ainsi que de la destination finale du lot.

Conclusions et perspectives

L'intérêt du contrôle des traces de farines animales réside dans la détection des fragments d'os réalisée par la MO mais également d'autres fragments comme les plumes, écailles ou fibres musculaires. La détection peut aussi cibler les PAT grâce aux techniques immunologiques (détection des protéines comme Ag) ou des techniques PCR ciblant des fragments d'ADN. La détection des traces doit aboutir à une VPN proche de 100 %. Il n'est pas opportun de laisser passer un FN d'où le souci primordial



* PAT de porcs interdites dans l'alimentation des porcs et PAT de volailles interdites dans l'alimentation des volailles (interdiction du cannibalisme)

** interdiction de nourrir les poissons d'élevage avec des PAT de poissons d'élevage, mais autorisation pour les PAT de poissons de mer

Fig. 2
Schéma de testage envisageable pour les protéines animales transformées

d'obtenir une Se la plus élevée possible. La MO garde évidemment sa place mais des améliorations peuvent être faites pour en améliorer la Se . La caméra NIR est d'exécution rapide et offre l'avantage de pouvoir traiter un grand nombre d'échantillons par unité de temps. Elle pourrait permettre de passer en revue toute les matières premières afin d'isoler et de retirer de la chaîne de fabrication des lots susceptibles d'être contaminés. Les techniques immunologiques sont potentiellement intéressantes pour vérifier l'application du TTL et déterminer le tissu de provenance et d'origine de celui-ci. La détection des TnI semble prometteuse mais des améliorations en termes de Sp sont encore nécessaires. Les tests sur tigelette sont rapides, à portée de tous et bon

marché, mais ont un seuil de détection non adapté aux exigences européennes. La PCR permettrait alors, avec sa Sp très élevée de confirmer et préciser l'espèce d'origine, alors que le tissu d'origine (prohibé ou non) pourrait être déterminé antérieurement par un test ELISA.

Actuellement, seule la MO permet une quantification des PAT dans l'alimentation du bétail mais la faible reproductibilité de la méthode empêche son application dans un contrôle officiel.

Allier les performances de la caméra NIR et l'ELISA qui autorisent une détection et une détermination de l'appartenance ou non au matériel prohibé, à la Q-PCR qui

autorise la confirmation d'espèce, permettrait d'aboutir à un meilleur outil de détection. Des techniques olfactométriques sont également en développement (17). Par ailleurs, le renforcement de la législation et du contrôle concernant la traçabilité des aliments doit être poursuivi pour prévenir l'occurrence d'EST en évitant tout risque de fraude. La législation s'oriente vers un étiquetage semi ouvert, c'est-à-dire avec mention de tous les ingrédients constituant l'aliment mais sans mention des teneurs. Celles-ci seront connues via les formules de composition des aliments indiquées sur l'étiquetage. La détection des PAT doit se dérouler dans une Europe harmonisée.

Les perspectives portent également sur la quantité du produit à analyser : faut-il tester tout le volume de matières premières (approche holistique) ou continuer à pratiquer un échantillonnage tel qu'actuellement ? L'échantillonnage sera toujours nécessaire car la détection en continu sur le site de débarquement et de production générerait un volume trop important à tester dans un temps trop court.

Une corrélation entre l'âge à la détection des cas d'ESB et le niveau de contamination de l'alimentation a été documentée (114). Des doses très faibles de prions pathogènes (1 mg au lieu d'1 g) peuvent être infectantes et occasionner l'ESB. En outre, la transmission de l'ESB par de faibles quantités de PAT, même en dessous de 0,1 % dans l'alimentation des bovins ne peut pas être exclue (29).

Ainsi, dans les pays où l'âge à la détection augmente (EU-15), l'avenir des méthodes de détection s'oriente vers une diminution de la LOD. Cependant, la définition de la LOQ n'est pas possible actuellement à cause du manque de données concernant la performance de la MO comme méthode quantitative.

La problématique restera une problématique de détection de traces de PAT. Seules les bonnes pratiques peuvent les diminuer. Une forte diminution du nombre de cas d'ESB enregistrés a été constatée suite à l'application de cette mesure de protection.

Avoir un outil de détection hautement fiable pour la détermination de l'espèce d'origine des farines animales permettrait d'assouplir la législation et de valoriser au mieux des matières alimentaires.

Detection of processed animal protein: European experience and perspectives

B.M. Plouvier, V. Baeten, J.P. Maudoux, E. Vanopdenbosch, D. Berkvens, G. Degand & C. Saegerman

Summary

European Commission Regulation (EC) No. 152/2009 imposes optical microscopy as the reference method for official controls to detect traces of animal protein in animal feed. Since 1 July 2004, the one-solvent technique has been the only authorised variant of optical microscopy. Its detection limit is 0.1% of meat-and-bone meal. Other techniques – using molecular biology (polymerase chain reaction, immunology), microscopy or near-infrared imaging – have been developed in the past ten years to supplement the official method, which has certain limitations. This paper compares and discusses the different techniques, highlighting the strengths of each technique in order to propose a feasible control scheme to improve the sensitivity and specificity of the technique for the detection of processed animal protein in livestock feed.

Keywords

Bovine spongiform encephalopathy – Cross-contamination – Detection techniques – Europe – Meat-and-bone meal – Processed animal protein – Trace elements.

DetECCIÓN DE PROTEÍNAS ANIMALES TRANSFORMADAS: EXPERIENCIA Y PERSPECTIVAS EUROPEAS

B.M. Plouvier, V. Baeten, J.P. Maudoux, E. Vanopdenbosch, D. Berkvens, G. Degand & C. Saegerman

Resumen

En el Reglamento europeo 152/2009/CE se impone la microscopía óptica como método de referencia para los controles oficiales destinados a detectar trazas de proteínas animales en la alimentación animal. Desde el 1º de julio de 2004, la técnica con un disolvente es la única variante autorizada de la microscopía óptica. Su umbral de detección admitido es de un 0,1 % de harinas cárnicas y óseas. Con el fin de reemplazar el método oficial, que adolece de ciertas limitaciones, en los últimos diez años se han puesto a punto otras técnicas de biología molecular (reacción en cadena de la polimerasa [PCR], inmunología), de microscopía o de imagen de infrarrojo próximo. Los autores examinan y comparan las diferentes técnicas con objeto de poner de relieve los puntos fuertes de cada una de ellas y proponer un sistema de control con técnicas que ofrezcan mayores niveles de sensibilidad y especificidad para detectar proteínas animales transformadas en la alimentación del ganado.

Palabras clave

Contaminaciones cruzadas – Elementos en trazas – Encefalopatía espongiiforme bovina – Europa – Harinas animales – Proteínas animales transformadas – Técnicas de detección.



Bibliographie

1. Agence fédérale de la sécurité de la chaîne alimentaire (AFSCA) (2008). – Circulaire du 24 avril 2008 relative à l'élimination des matériels à risque spécifiés (MRS), notamment en fonction des modifications apportées en dernier lieu par le règlement (CE) n° 357/2008 de la Commission du 22 avril 2008 modifiant le règlement (CE) n° 999/2001 du Parlement européen et du Conseil fixant les règles pour la prévention, le contrôle et l'éradication de certaines encéphalopathies spongiformes transmissibles. Page web : www.afsca.be/sp/sous-prod/doc07/2008-04-25_circulaire-MRS_FR.pdf (consultée le 22 juillet 2008).
2. Andrews C., Berger R., Magneau R., Schwab B. & Johnston R. (1992). – Detection of beef, sheep, deer, and horse meat in cooked meat products by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. AOAC int.*, **75**, 572-576.
3. Ansfield M., Reaney S. & Jackman R. (2000). – Production of a sensitive immunoassay for detection of ruminant and porcine proteins, heated to > 130°C at 2.7 bar, in compound animal feedstuffs. *Food agric. Immunol.*, **12**, 273-284.
4. Ansfield M., Reaney S. & Jackman R. (2000). – Performance assessment and validation of a sensitive immunoassay for detection of ruminant and porcine heat stable proteins in compound animal feedstuffs. *Food agric. Immunol.*, **12**, 285-297.
5. Aristoy M.C. & Toldra F. (2004). – A simple, fast and reliable methodology for the analysis of histidine dipeptides as markers of the presence of animal origin proteins in feeds for ruminants. *Food Chem.*, **84**, 485-491.
6. Aristoy M.C. & Toldra F. (2004). – Histidine dipeptides HPLC-based test for the detection of mammalian origin proteins in feed for ruminants. *Meat Sci.*, **67**, 211-217.
7. Baeten V., von Holst C., Fissiaux I., Michotte Renier A., Murray I. & Dardenne P. (2005). – The near infrared microscopic (NIRM) method: a combination of the advantages of optical microscopy and near-infrared spectroscopy (WP5). *In Strategies and methods to detect and quantify mammalian tissues in feedingstuffs*. Office des publications de l'Union européenne, Luxembourg, 71-97.

8. Baeten V., von Holst C., Garrido A., Vancutsem J., Michotte Renier A. & Dardenne P. (2005). – Detection of banned meat and bone meal in feedstuffs by near-infrared microscopic analysis of the dense sediment fraction. *Analyt. bioanalyt. Chem.*, **382**, 149-157.
9. Bellagamba F., Commencini S., Ferretti L., Valfre F. & Moretti V. (2006). – Application of quantitative real-time PCR in the detection of prion-protein gene species-specific DNA sequences in animal meals and feedstuffs. *J. Food Protec.*, **69**, 891-896.
10. Bellagamba F., Moretti V.M., Commencini S. & Valfre F. (2001). – Identification of species in animal feedstuffs by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of mitochondrial DNA. *J. agric. Food Chem.*, **49**, 3775-3781.
11. Bellagamba F., Valfre F., Panseri S. & Moretti V. (2003). – Polymerase chain reaction-based analysis to detect terrestrial animal protein in fish meal. *J. Food Protec.*, **66**, 513-518.
12. Bjorklund E., Pallaroni L., Von Holst C. & Unglaub W. (2001). – Method of determination of appropriate heat treatment of animal meal by immunoassay developed for detection of cooked beef: interlaboratory study. *J. AOAC int.*, **84** (6), 1839-1845.
13. Bottero M., Dalmaso I., Nucera D., Turi R., Rosati S., Squadrone S., Gorla M. & Civera T. (2003). – Development of a PCR assay for the detection of animal tissues in ruminant feeds. *J. Food Protec.*, **66**, 2307-2312.
14. Brodmann P.D. & Moor D. (2003). – Sensitive and semi-quantitative TaqMan™ real-time polymerase chain reaction systems for the detection of beef (*Bos taurus*) and the detection of the family *Mammalia* in food and feed. *Meat Sci.*, **65**, 599-607.
15. Bruce M., Will R., Ironside J., McConnell I., Drummond D., Suttie A., McCardle L., Chree A., Hope J., Birkett C., Cousens S., Fraser H. & Bostock C. (1997). – Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature*, **389**, 498-501.
16. Calvo J., Rodellar C., Zaragoza P. & Osta R. (2002). – Beef- and bovine-derived material identification in processed and unprocessed food and feed by PCR amplification. *J. agric. Food Chem.*, **50**, 5262-5264.
17. Campagnoli A., Pinotti L., Tognon G., Cheli F., Baldi A. & Dell'Orto V. (2004). – Potential application of electronic nose in processed animal proteins (PAP) detection in feedstuffs. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **8** (4), 253-255.
18. Chen F. & Hsieh Y.-H. (2000). – A monoclonal antibody-based ELISA for detection of pork in heat processed meat products. *J. AOAC int.*, **83**, 79-85.
19. Chen F. & Hsieh Y.-H. (2001). – Separation and characterization of a porcine-specific thermostable muscle protein from cooked pork. *J. Food Sci.*, **66**, 799-803.
20. Chen F., Hsieh Y.-H. & Bridgman C. (1998). – Monoclonal antibodies to porcine thermal-stable muscle protein for detection of pork in raw and cooked meats. *J. Food Sci.*, **63**, 201-205.
21. Chen F., Hsieh Y.-H. & Bridgman C. (2002). – Monoclonal antibodies against troponin I for the detection of rendered muscle tissues in animal feedstuffs. *Meat Sci.*, **62**, 405-412.
22. Chen F., Hsieh Y.-H. & Bridgman C. (2004). – Monoclonal antibody-based sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for sensitive detection of prohibited ruminant proteins in feedstuffs. *J. Food Protec.*, **67**, 544-549.
23. Colgan S., O'Brien L., Maher M., Shilton N., McDonnell K. & Ward S. (2001). – Development of a DNA-based assay for species identification in meat and bone meal. *Food Res. int.*, **34** (5), 409-414.
24. Colombo F., Marchisio E., Trezzi I., Peri V., Pinotti L., Baldi A. & Soncini G. (2004). – A preliminary trial using multi-target polymerase chain reaction (multiplex PCR) and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) on the same feedstuffs to detect tissues of animal origin. *Vet. Res. Commun.*, **28**, 461-466.
25. Collinge J. & Rossor M. (1996). – A new variant of prion disease. *Lancet*, **347**, 916-917.
26. Department for Environment, Food and Rural Affairs (DEFRA) (2008). – Bovine spongiform encephalopathy in Great Britain: confirmed cases by year of birth. Page web : www.defra.gov.uk/animalh/bse/bse-statistics/bse/yrbirth.html (consultée le 14 août 2008).
27. Detwiler L. (1992). – Scrapie. In *Encéphalopathies spongiformes transmissibles des animaux* (R. Bradley & D. Matthews, édit.). *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **11** (2), 491-537.
28. Dubois M., Fumière O., von Holst C. & Berben G. (2002). – Meat and bone meal detection in feed by search of specific animal DNA segments. In 181th Meeting of the Belgian Society of Biochemistry and Molecular Biology, 4 May, Katholieke Universiteit Leuven, Heverlee, Belgium, Abstr. 7. Résumé disponible sur le Web : www.biochemistry.be/4may2002/abstracts_1_13.htm (consulté le 5 août 2008).
29. European Food Safety Authority (2005). – Opinion on the quantitative risk assessment of the animal BSE risk posed by meat and bone meal with respect to the residual BSE risk. *EFSA J.*, **257**, 1-30.
30. European Food Safety Authority (2007). – Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on the revision of the geographical BSE risk assessment (GBR) methodology. *EFSA J.*, **463**, 1-35.
31. European Food Safety Authority (2007). – Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on certain aspects related to the risk of transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) in ovine and caprine animals. *EFSA J.*, **466**, 1-10.

32. European Food Safety Authority (2007). – Opinion of the Scientific Panel on Biological hazards on certain aspects related to the feeding of processed animal proteins to farm animals. *EFSA J.*, **576**, 1-41.
33. European Food Safety Authority (2008). – Scientific and technical clarification in the interpretation and consideration of some facets of the conclusions of its Opinion of 8 March 2007 on certain aspects related to the risk of transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) in ovine and caprine animals. *EFSA J.*, **626**, 1-11.
34. Eurostat (2008). – Cheptels bovins (données annuelles). Page web : http://appsso.eurostat.ec.europa.eu/nui/show.do?dataset=apro_mt_lscat1&lang=fr (consultée le 2 décembre 2012).
35. Fernandez Pierna J., Baeten V., Renier A.M., Cogdill R. & Dardenne P. (2004). – Combination of support vector machines (SVM) and near-infrared (NIR) imaging spectroscopy for the detection of meat and bone meal (MBM) in compound feeds. *J. Chemometr.*, **18** (7-8), 341-349.
36. Frezza D., Favaro M., Vaccari G., von Holst C., Giambra V., Anklam E., Bove D., Battaglia P., Agrimi U., Brambilla G., Ajmone-Marsan P. & Tartaglia M. (2003). – A competitive polymerase chain reaction-based approach for the identification and semi-quantification of mitochondrial DNA in differently heat-treated bovine meat and bone meal. *J. Food Protec.*, **66**, 103-109.
37. Fulwyler M. & McHugh T. (1990). – Flow microsphere immunoassay for the quantitative and simultaneous detection of multiple soluble analytes. *Meth. cell. Biol.*, **33**, 613-629.
38. Fumière O., Dubois M., Baeten V., von Holst C. & Berben G. (2006). – Effective PCR detection of animal species in highly processed animal by-products and compound feeds. *Analyt. bioanalyt. Chem.*, **385**, 1045-1054.
39. Gizzi G., van Raamsdonk L., Baeten V., Murray I., Berben G., Brambilla G. & von Holst C. (2003). – An overview of tests for animal tissues in feeds applied in response to public health concerns regarding bovine spongiform encephalopathy. In *Analyse du risque des maladies à prions chez les animaux* (C.I. Lasmézas & D.B. Adams, éd.). *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **22** (1), 311-331.
40. Gizzi G., von Holst C., Baeten V., Berben G. & van Raamsdonk L. (2004). – Determination of processed animal proteins, including meat and bone meal, in animal feed. *J. AOAC int.*, **87**, 1334-1341.
41. Hauw J.J. (2001). – Creutzfeldt-Jakob, une maladie orpheline. Page web : bulletin.conseil-national.medecin.fr/Archives/html/204/204BOMN204P16A1.htm (consultée le 5 août 2008).
42. Hill A., Desbruslais M., Joiner S., Sidle K., Gowland J., Collinge L., Doey L. & Lantos P. (1997). – The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature*, **389**, 448-450.
43. Hird H., Chisholm J., Sanchez A., Hernandez M., Goodier R., Schneede K., Boltz C. & Popping B. (2006). – Effect of heat and pressure processing on DNA fragmentation and implication for the detection of meat using a real-time polymerase chain reaction. *Food Addit. Contam.*, **23**, 645-650.
44. Hofmann K. (1996). – Proof of proper heating at meat-and-bone meal. *Fleischwirtschaft*, **76**, 1037-1039.
45. Hofmann K. (1997). – Safe controls for renewed confidence: the ELISA meat and bone meal. *Fleischerei*, **11**, 3-4.
46. Hsieh Y.-H.P., Zhang S., Chen F. & Sheu S. (2002). – Monoclonal antibody-based ELISA for assessment of endpoint heating temperature of ground pork and beef. *J. Food Sci.*, **67**, 1149-1154.
47. Kim S., Huang T., Seymour T., Wei C., Kempf S., Bridgman C., Clemens R. & An H. (2004). – Identification of a biomarker for the detection of prohibited meat and bone meal residues in animal feed. *J. Food Sci.*, **69** (9), 739-745.
48. Kim S., Huang T., Seymour T., Wei C., Kempf S., Bridgman C., Clemens R. & An H. (2004). – Production of monoclonal antibody for the detection of meat and bone meal in animal feed. *J. agric. Food Chem.*, **52**, 7580-7585.
49. Kim S., Huang T., Seymour T., Wei C., Kempf S., Bridgman C., Momcilovic D., Clemens R. & An H. (2005). – Development of immunoassay for detection of meat and bone meal in animal feed. *J. Food Protec.*, **68** (9), 1860-1865.
50. Kingombe C., Lüthi E., Schlosser H., Howald D., Kuhn M. & Jemmi T. (2001). – A PCR-based test for species-specific determination of heat treatment conditions of animal meals as an effective prophylactic method for bovine spongiform encephalopathy. *Meat Sci.*, **57**, 35-41.
51. Klein F., Lupo T., Pielack D. & Mozola M. (2005). – Validation study of a lateral-flow immunoassay for detection of ruminant by-product material in animal feeds and feed ingredients. *J. AOAC int.*, **88**, 1583-1592.
52. Krcmár P. & Rencová E. (2001). – Identification of bovine-specific DNA in feedstuffs. *J. Food Protec.*, **64**, 117-119.
53. Krcmár P. & Rencová E. (2003). – Identification of species-specific DNA in feedstuffs. *J. agric. Food Chem.*, **51**, 7655-7658.
54. Krcmár P. & Rencová E. (2005). – Quantitative detection of species-specific DNA in feedstuffs and fish meals. *J. Food Protec.*, **68**, 1217-1221.
55. Lahiff S., Glennon M., Lyng J., Smith T., Shilton N. & Maher M. (2002). – Real-time polymerase chain reaction detection of bovine DNA in meat and bone meal samples. *J. Food Protec.*, **65**, 1158-1165.
56. Lahiff S., Glennon M., O'Brien L., Lyng J., Smith T., Maher M. & Shilton N. (2001). – Species-specific PCR for the identification of ovine, porcine and chicken species in meat and bone meal. *Molec. cell. Probes*, **15**, 27-35.

57. Lasmézas C.I., Deslys J-P., Demaimay R., Adjou K, Lamoury F, Dormont D., Robain O., Ironside J. & Hauw J.-J. (1996). – BSE transmission to macaques. *Nature*, **381**, 743-744.
58. Lasmézas C.I., Fournier J.G., Nouvel V, Boe H., Marce D., Lamoury F, Kopp N., Hauw J.J., Ironside J., Bruce M., Dormont D. & Deslys J.P. (2001). – Adaptation of the bovine spongiform encephalopathy agent to primates and comparison with Creutzfeldt-Jakob disease: implications for human health. *Proc. natl Acad. Sci. USA*, **98**, 4142-4147.
59. Maudoux J.P. (2005). – Encéphalopathie spongiforme bovine : quel est le niveau de sécurité des aliments pour animaux mis sur le marché belge après l'entrée en vigueur de l'interdiction alimentaire étendue ? (Mémoire). AFSCA, Bruxelles, Belgique, 54 pp.
60. Mendoza-Romero L., Verkaar E.L.C., Savelkoul P.H., Catsbourg A., Aarts H.J.M., Buntjer J.B. & Lenstra J. (2004). – A real time PCR detection of ruminant DNA. *J. Food Protec.*, **67**, 550-554.
61. Michard J. & Ziebal R. (1999). – Mise au point d'une méthode microscopique de détection des farines de viande, d'os et de poisson dans les aliments pour animaux. *Ann. Falsific. Expert. chim. toxicol.*, **92**, 209-223.
62. Michotte-Renier A., Baeten V., Sinnaeve G., Fernandez Pierna J.A. & Dardenne P. (2004). – The NIR camera: a new perspective for meat and bone meal detection in feedingstuffs. In *Near Infrared Spectroscopy: Proceedings of the 11th International Conference* (A.M.C. Davies & A. Garrido-Varo, édit.). NIR Publications, Chichester, Royaume-Uni, 1061-1065.
63. Miller J.C. & Miller J.N. (1988). – Limits of detection. In *Statistics for analytical chemistry* (J.C. Miller & J.N. Miller, édit.), 2^e éd. Ellis Horwood, Chichester, 115-117.
64. Momcilovic D. & Rasooly A. (2000). – Detection and analysis of animal materials in food and feed. *J. Food Protec.*, **63**, 1602-1609.
65. Murayama Y., Yoshioka M., Horii H., Takata M., Miura K. & Shinagawa M. (2006). – Specific detection of prion antigenic determinants retained in bovine meat and bone meal by flow microbead immunoassay. *J. appl. Microbiol.*, **101**, 369-376.
66. Murray I., Aucott L.S. & Pike H. (2001). – Use of discriminant analysis on visible and near infrared reflectance spectra to detect adulteration of fishmeal with meat and bone meal. *J. near Infrared Spectrosc.*, **9**, 297-311.
67. Murray I., Garrido-Varo A., Perez-Marin M.D., Guerrero J.E., Baeten V., Dardenne P., Termes S., Zegers J. & Frankhuisen R. (2005). – Macroscopic near infrared reflectance spectroscopy (WP5). In *Strategies and methods to detect and quantify mammalian tissues in feeding stuffs*. Office des publications de l'Union européenne, Luxembourg, 98-111. Page web : bookshop.europa.eu/eubookshop/FileCache/PUBPDF/KINA21124ENC/KINA21124ENC_002.pdf.
68. Myers M.J., Yancy H.F. & Farrell D.E. (2003). – Characterization of a polymerase chain reaction-based approach for the simultaneous detection of multiple animal-derived materials in animal feed. *J. Food Protec.*, **66**, 1085-1089.
69. Myers M.J., Yancy H.F., Araneta M., Armour J., Derr J., Hoostelaere L.A., Farmer D., Jackson F., Kiessling W.M., Koch H., Lin H., Liu Y., Mowlds G., Pinero D., Riter K.L., Sedwick J., Shen Y., Wetherington J. & Younkens R. (2006). – Validation of a PCR-based method for detection of various rendered materials in feedstuffs using a forensic DNA extraction kit. *J. Food Protec.*, **69**, 205-210.
70. Myers M.J., Yancy H.F., Farrell D.E., Washington J.D. & Frobish R.A. (2005). – Evaluation of two commercial lateral-flow test kits for detection of animal proteins in animal feed. *J. Food Protec.*, **68**, 2656-2664.
71. Ofori J.A. & Hsieh Y.H. (2007). – Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine blood in animal feed. *J. agric. Food Chem.*, **55** (15), 5919-5924.
72. Organisation mondiale de la santé animale (OIE) (2005). – Pays/territoires signalé des cas d'ESB uniquement chez des animaux importés. Page web : www.oie.int/eng/info/en_esbimport.htm (consultée le 16 octobre 2008).
73. Organisation mondiale de la santé animale (OIE) (2007). – Répartition géographique des pays ayant déclaré des cas confirmés d'ESB depuis 1989. Page web : www.oie.int/fr/info/fr_esbcarte.htm (consultée le 16 octobre 2008).
74. Organisation mondiale de la santé animale (OIE) (2008). – Nombre de cas d'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) signalés chez les bovins d'élevage dans le monde, hors Royaume-Uni. Page web : www.oie.int/eng/info/en_esbmonde.htm (consultée le 16 octobre 2008).
75. Piraux F. & Dardenne P. (2000). – Microscopie-NIR appliquée aux aliments du bétail. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **4**, 226-232.
76. Prado M., Berben G., Fumière O., Van Duijn G., Mensinga-Kruize J., Reaney S., Boix A. & Von Holst C. (2007). – Detection of ruminant meat and bone meals in animal feed by real-time polymerase chain reaction: result of an interlaboratory study. *J. agric. Food Chem.*, **55**, 7495-7501.
77. Prusiner S.B. (1982). – Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, **216**, 136-144.
78. Quinn P.J., Boldyrev A.A. & Formazuyk V.E. (1992). – Carnosine: its properties, functions and potential therapeutic applications. *Molec. Asp. Med.*, **13**, 379-444.
79. Rao Q. (2004). – Monoclonal antibody-based sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of mammalian meat in meat and feed products. Department of Nutrition, Food and Exercise Sciences in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science, Florida State University, 70 pp.

80. Rensen G., Smith W., Ruzante J., Sawyer M., Osburn B. & Cullor J. (2005). – Development and evaluation of a real-time fluorescent polymerase chain reaction assay for the detection of bovine contaminants in cattle feed. *Foodborne Path. Dis.*, **2**, 152-159.
81. Schönherr J. (2002). – Analysis of products of animal origin in feeds by determination of carnosine and related dipeptides by high-performance liquid chromatography. *J. agric. Food Chem.*, **50**, 1945-1950.
82. Sigurdson C.J. & Miller M.W. (2003). – Other animal prion diseases. *Br. med. Bull.*, **66**, 199-212.
83. Tajima K., Enishi O., Amari M., Mitsumori M., Kajikawa H., Kurihara M., Yanai S., Matsui H., Yasue H., Mitsunashi T., Kawashima T. & Matsumoto M. (2002). – PCR detection of DNAs of animal origin in feed by primers based on sequences of short and long interspersed repetitive elements. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 2247-2250.
84. Tartaglia M., Saule E., Pestalozza S., Morelli L., Antonucci G. & Battaglia P. (1998). – Detection of bovine mitochondrial DNA in ruminant feeds: a molecular approach to test for the presence of bovine-derived materials. *J. Food Protec.*, **61**, 513-518.
85. Toma B., Benet J.J., Dufour B., Eloit M., Moutou F. & Sanaa M. (1991). – Glossaire d'épidémiologie animale. Éditions du Point vétérinaire, Maisons-Alfort, 365 pp.
86. Toorop M.R., Murch S. J. & Ball R.O. (1997). – Development of a rapid and accurate method for separation and quantification of myofibrillar proteins in meat. *Food Res. int.*, **30**, 619-627.
87. Union européenne (UE) (1993). – Décision 93/256/CE de la Commission, du 14 avril 1993, arrêtant les méthodes à utiliser pour la recherche de résidus et de substances à effet hormonal et de substances à effet thyrostatique. *Off. J. Eur. Communities*, 1993, **L 118**, 64-74.
88. Union européenne (UE) (1994). – Décision 94/381/CE de la Commission, du 27 juin 1994, concernant certaines mesures de protection relatives à l'encéphalopathie spongiforme bovine et à l'alimentation à base de protéines dérivées de mammifères. *Off. J. Eur. Communities*, **L 172**, 23-24.
89. Union européenne (UE) (1998). – Directive 98/67/CE de la Commission, du 7 septembre 1998, modifiant les directives 80/511/CEE, 82/475/CEE, 91/357/CEE et la directive 96/25/CE du Conseil et abrogeant la directive 92/87/CEE. *Off. J. Eur. Communities*, **L 261**, 10-31.
90. Union européenne (UE) (1998). – Directive 98/88/CE de la Commission du 13 novembre 1998 établissant les lignes directrices pour l'identification et l'estimation, par examen microscopique, des constituants d'origine animale pour le contrôle officiel des aliments pour animaux. *Off. J. Eur. Communities*, **L 318**, 45-50.
91. Union européenne (UE) (1999). – Décision du Conseil 1999/534/EC, du 19 juillet 1999, concernant les mesures applicables au traitement de certains déchets animaux aux fins de la protection contre les encéphalopathies spongiformes transmissibles, et modifiant la décision 97/735/CE de la Commission. *Off. J. Eur. Communities*, **L 204**, 37-42.
92. Union européenne (UE) (2000). – Décision 2000/766/CE du Conseil du 4 décembre 2000 relative à certaines mesures de protection à l'égard des encéphalopathies spongiformes transmissibles et à l'utilisation de protéines animales dans l'alimentation des animaux. *Off. J. Eur. Communities*, **L 306**, 32-33.
93. Union européenne (UE) (2001). – Décision de la Commission (2001/9/CE) du 29 décembre 2000 relative aux mesures de contrôle requises pour la mise en œuvre de la décision 2000/766/CE du Conseil relative à certaines mesures de protection à l'égard des encéphalopathies spongiformes transmissibles et à l'utilisation de certaines protéines animales dans l'alimentation des animaux. *Off. J. Eur. Communities*, **L 2**, 32-40.
94. Union européenne (UE) (2001). – Règlement (CE) n° 999/2001 du Parlement européen et du Conseil du 22 mai 2001 fixant les règles pour la prévention, le contrôle et l'éradication de certaines encéphalopathies spongiformes transmissibles. *Off. J. Eur. Communities*, **L 147**, 1-40.
95. Union européenne (UE) (2002). – Règlement (CE) n° 178/2002 du Parlement européen et du Conseil du 28 janvier 2002 établissant les principes généraux et les prescriptions générales de la législation alimentaire, instituant l'Autorité européenne de sécurité des aliments et fixant des procédures relatives à la sécurité des denrées alimentaires. *Off. J. Eur. Communities*, **L 31**, 1-24.
96. Union européenne (UE) (2002). – Règlement (CE) n° 1774/2002 du Parlement européen et du Conseil du 3 octobre 2002 établissant des règles sanitaires applicables aux sous-produits animaux non destinés à la consommation humaine. *Off. J. Eur. Communities*, **L 273**, 1-95.
97. Union européenne (UE) (2003). – Recommandation 2003/91/CE de la Commission du 10 février 2003 relative au programme coordonné d'inspection dans le domaine de l'alimentation des animaux pour l'année 2003 conformément à la directive 95/53/CE du Conseil. *Off. J. Eur. Communities*, **L 34**, 20-25.
98. Union européenne (UE) (2007). – Règlement (CE) n° 1432/2007 de la Commission du 5 décembre 2007 modifiant les annexes I, II et VI du règlement (CE) n° 1774/2002 du Parlement européen et du Conseil en ce qui concerne le marquage et le transport de sous-produits animaux. *Off. J. Eur. Communities*, **L 320**, 13-17.
99. Union européenne (UE) (2008). – Règlement (CE) n° 315/2008 de la Commission du 4 avril 2008 modifiant l'annexe X du règlement (CE) n° 999/2001 du Parlement européen et du Conseil en ce qui concerne les listes de tests rapides. *Off. J. Eur. Communities*, **L 94**, 3-5.

100. Union européenne (UE) (2008). – Règlement (CE) n° 357/2008 de la Commission du 22 avril 2008 modifiant l'annexe V du règlement (CE) n° 999/2001 du Parlement européen et du Conseil fixant les règles pour la prévention, le contrôle et l'éradication de certaines encéphalopathies spongiformes transmissibles. *Off. J. Eur. Communities*, **L 111**, 3-4.
101. Union européenne (UE) (2009). – Règlement (EC) n° 152/2009 de la Commission du 27 Janvier 2009 portant fixation des méthodes d'échantillonnage et d'analyse destinées au contrôle officiel des aliments pour animaux. *Off. J. Eur. Communities*, **L 54**, 1-130.
102. Union européenne (UE) (2009). – Règlement (CE) n° 220/2009 du Parlement européen et du conseil du 11 mars 2009 modifiant le règlement (CE) n° 999/2001 fixant les règles pour la prévention, le contrôle et l'éradication de certaines encéphalopathies en ce qui concerne les compétences d'exécution conférées à la Commission. *Off. J. Eur. Communities*, **L 87**, 155-156.
103. Van Raamsdonk L.W.D. & Van der Voet H.J. (2003). – A ring trial for the detection of animal tissues in feeds in the presence of fish meal, Report 2003.012. RIKILT, Wageningen, 17 pp. avec 6 annexes.
104. Van Raamsdonk L.W.D., von Holst C., Baeten V., Berben G., Boix A. & de Jong J. (2007). – New developments in the detection and identification of processed proteins in feeds. *J. Anim. Feed Sci.*, **133**, 63-83.
105. Veys P. & Baeten V. (2007). – CRL-AP Interlaboratory study 2006 Final report. CRL-AP, CRA-W, Gembloux, Belgique, 23 pp.
106. Veys P. & Baeten V. (2008). – CRL-AP Interlaboratory study 2007 Final report. CRL-AP, CRA-W, Gembloux, Belgique, 26 pp.
107. Veys P., Berben G. & Baeten V. (2007). – CRL-AP Proficiency Test 2007 Final report. CRL-AP, CRA-W, Gembloux, Belgique, 14 pp.
108. Von Holst C. & Anklam E. (1999). – Final report method for the detection of bovine mitochondrial DNA in animal feedingstuffs of plant origin. Final report of the competitive support project N° 86-7920/97/000008. Part 2. Validation study. Joint Research Centre, Ispra, Italie, 35 pp.
109. Von Holst C., Baeten V., Berben G. & Brambilla G. (2004). – Overview of methods for the detection of species specific proteins in feed intended for farmed animals. Commission européenne. Page web : ec.europa.eu/comm/food/food/biosafety/bse/bse52_en.pdf (consultée le 5 août 2008).
110. Von Holst C., Boix A., Baeten V., Vancutsem J. & Berben G. (2006). – Determination of processed animal proteins in feed: the performance characteristics of classical microscopy and immunoassay methods. *Food Addit. Contam.*, **23**, 252-264.
111. Von Holst C., Honikel K. O., Unglaub W., Kramer G. & Anklam E. (2000). – Determination of an appropriate heat treatment of animal waste using the ELISA technique: results of a validation study. *Meat Sci.*, **54**, 1-7.
112. Von Holst C., Unglaub W. & Anklam E. (2001). – Post process product control of rendering plant sterilization conditions by ELISA. *J. AOAC int.*, **84**, 1793-1798.
113. Wang R.F., Myers M.J., Campbell W., Cao W.W., Paine D. & Cerniglia C.E. (2000). – A rapid method for PCR detection of bovine materials in animal feedstuffs. *Molec. cell. Probes*, **14**, 1-5.
114. Wells G.A.H., Konold T., Arnold M.E., Austin A.R., Hawkins S.A.C., Stack M.J., Simmons M.M., Lee Y.H., Gavier-Widen D., Dawson M. & Wilesmith J.W. (2007). – Bovine spongiform encephalopathy: the effect of oral exposure dose on attack rate and incubation period in cattle. *J. gen. Virol.*, **88**, 1363-1373.
115. Wells G.A., Scott A.C., Johnson C.T., Gunning R.F., Hancock R.D., Jeffrey M., Dawson M. & Bradley R. (1987). – A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet. Rec.*, **121**, 419-420.
116. Wilesmith J.W., Ryan J.B.M. & Atkinson M.J. (1991). – Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin. *Vet. Rec.*, **128**, 199-203.
117. Wilesmith J.W., Wells G.A.H., Cranwell M.P. & Ryan J.B.M. (1988). – Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies. *Vet. Rec.*, **123**, 638-644.
118. Will R.G., Ironside J.W., Zeidler S., Cousens S.N., Estibeiro K., Alperovitch A., Poser S., Pocchiari M., Hofmann A. & Smith P.G. (1996). – A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet*, **347**, 264-267.
119. Yancy H.F., Mohla A., Farrell D.E. & Myers M.J. (2005). – Evaluation of a rapid PCR-based method for the detection of animal material. *J. Food Protec.*, **68**, 2651-2655.

