



Labinfo

Publication destinée aux laboratoires de sécurité alimentaire agréés

- p. 4 Analyse du triheptanoate de glycérol dans les sous-produits animaux
- p. 7 Les vitamines
- p. 12 Le glyphosate dans tous ses états
- p. 17 Risques de migration dans les théières traditionnelles en métal
- p. 19 Les allergies alimentaires
- p. 24 LNR-OGM : Projet de recherche « GMOseek (2009-2011) pour la détection d'OGM
- p. 28 Vers une plus grande collaboration européenne en matière de quarantaine végétale
- p. 30 Nouvelles du Laboratoire européen de Référence pour le Lait et les Produits laitiers (EU-RL MMP), Paris, 2011
- p. 36 Workshops & Symposia



LabInfo

Publication destinée aux laboratoires de sécurité alimentaire agréés

Equipe de rédaction

Dirk Courtheyn, Mieke De Mits, Conny De Schepper, Alain Dubois, Marc Evrard, Alain Laure, Bert Vandenborre, Mieke Van de Wiele, Eva Wevers et Marie-Christine Wilem

Ont participé à ce numéro :

Geert De Poorter, Eva Wevers, Mieke Vanbrabant, Séverine Goscinny, Vincent Hanot, Fabien Bolle, Valéry Dumont, Sylvia Broeders, Elodie Barbau-Piednoir, Guillaume Mbongolo Mbella, Nina Papazova, Antoine Pouppez, Nancy Roosens, Isabel Taverniers, Marc De Loose, Frédéric Debode, Gilbert Berben, Eric Janssen, Thibaut Olivier, Anne Chandelier, Stéphan Steyer, Véronique Ninane et Koen De Reu.

Traduction

Service de traduction de l'Agence

Equipe de rédaction et du personnel de l'Administration des Laboratoires

Photos et illustrations

Fournies par les laboratoires

Mise en page

Gert Van Kerckhove

Secrétariat de rédaction

LabInfo

p.a. D. Courtheyn

AFSCA

CA-Botanique – Food Safety Center

4ème étage, bureau K04/120218

Boulevard du Jardin botanique 55

1000 Bruxelles

Tel 02.211.87.33

dirk.courtheyn@favv.be

Cher lecteur,

Je souhaite commencer cet éditorial en vous présentant mes meilleurs vœux ainsi qu'en vous souhaitant une bonne santé pour cette année 2012. "Quand la santé va, tout va", comme dit le dicton! L'année 2011 a suivi l'allure de montagnes russes, avec des hauts et beaucoup de bas. L'avenir s'annonce sombre selon les analystes, mais nous ne pouvons pas continuer à nous focaliser sur ces messages catastrophistes. Il est de notre devoir de continuer à innover et à nous montrer créatifs dans notre manière de penser et d'agir, c'est la seule façon de créer de la valeur ajoutée à toutes sortes de niveaux. L'AFSCA et la DG Laboratoires souhaitent y contribuer.

Durant la rédaction de mon nouveau plan de management/plan opérationnel, j'ai mené de nombreux entretiens d'une part avec les utilisateurs des résultats d'analyse des laboratoires agréés, pour les analyses dans le cadre du programme de contrôle officiel et du programme d'autocontrôle, et d'autre part avec les managers de ces laboratoires agréés.

La principale conclusion que j'ai pu en tirer est que les utilisateurs souhaiteraient obtenir leurs résultats encore plus rapidement et à un prix encore plus bas. Quant aux managers de laboratoire, ils sont principalement en quête d'une législation stable, avec des normes claires et des méthodes rapidement disponibles et fournissant des résultats précis.

En soi rien de neuf sous le soleil donc, mais pour traduire cela en objectifs concrets, c'est une autre histoire. Je tiens déjà à vous informer d'un certain nombre d'initiatives importantes que je compte développer en vue de répondre à ces souhaits.

Toutes les méthodes et dossiers de validation correspondants (excepté pour les substances interdites) utilisés par les laboratoires AFSCA seront publiés dans le courant de 2012 sur l'Intralab protégé.

Dans ce monde en évolution rapide, les laboratoires externes agréés pourront alors retrouver facilement une méthode et, de plus, ne devront plus constituer de dossiers de validation onéreux et mangeurs de temps ; une validation d'implémentation sera dans la plupart des cas suffisante.

Le fonctionnement des Laboratoires nationaux de Référence va être régularisé de manière plus conforme au marché, avec une assurance de la qualité encore meilleure.

Le développement de l'application NARVAL, permettant de consulter les normes et limites d'action, va être poursuivi. Cette application offre une plus grande sécurité juridique aux laboratoires tiers dans le cadre de la notification obligatoire et peut également être utilisé dans la consultance qu'ils fournissent à leurs clients car l'histoire des matrice/paramètre/norme-limite d'action est une chose ardue et complexe dans le monde de la sécurité alimentaire.

Dernier point, mais non des moindres : des négociations ont été entamées avec des PT-providers en vue de pouvoir injecter directement les résultats dans notre module PT Foodlims, de manière à ce que les laboratoires agréés puissent procéder à une analyse de tendance sans devoir ré-encoder les résultats. La simplification administrative et le laboratoire électronique deviennent ainsi de plus en plus une réalité.

Ce Labinfo "électronique" comporte à nouveau toute une série d'articles intéressants, je vous en souhaite bonne lecture.

Geert De Poorter

Directeur général des Laboratoires

Analyse du triheptanoate de glycérol dans les sous-produits animaux

Il s'est avéré dans les années nonante que certaines maladies animales transmissibles (par exemple les EST : encéphalopathies spongiformes transmissibles) pouvaient être propagées par le biais des sous-produits animaux. En outre, le cannibalisme (nourrir des animaux avec des protéines obtenues de cadavres de la même espèce animale) peut constituer un risque supplémentaire du point de vue de la propagation de maladies. Afin d'éviter que des sous-produits non destinés à la consommation humaine ne se retrouvent à nouveau dans la chaîne alimentaire, le Règlement 1774/2002 (Communautés européennes, 2002) a été établi. Selon le Règlement 1774/2002, les sous-produits animaux sont classés en trois catégories : la catégorie 1 (risque élevé), la catégorie 2 (risque modéré) et la catégorie 3 (risque faible).

À la demande de la DG de la Santé et des Consommateurs (DG SANCO), l'Institut des mesures et matériaux de référence du Centre commun de recherche de la Commission européenne (IRMM) a évalué les caractéristiques des différentes substances propres à être utilisées comme marqueurs pour les sous-produits animaux de catégories 1 et 2. En 2002, l'IRMM a proposé d'utiliser le triheptanoate de glycérol (GTH) comme marqueur. Le GTH semblait en effet être le "candidat marqueur" idéal. Le GTH est une graisse composée de 3 acides gras C7 (acide n-heptanoïque) estérifiés avec du glycérol. Le GTH n'est par conséquent pas présent dans la nature. La formule développée est reproduite à la figure 1. Les propriétés physico-chimiques du GTH font qu'il se mélange facilement aux graisses et aux produits contenant de la graisse. De plus, après ajout, le GTH ne peut être éliminé. C'est un produit sûr et non toxique qui est déjà utilisé pour d'autres applications dans l'industrie alimentaire, telles que le marquage du beurre. Le GTH est également une substance très stable qui résiste à un traitement thermique sous pression de vapeur à 133°C, tel qu'il est appliqué dans l'industrie de fonte des graisses. Le GTH est commercialisé sous forme de liquide clair transparent. Son coût est peu élevé et il ne faut pas en ajouter beaucoup (exigence légale : 250 mg/kg graisse). Il existe en effet une méthode sensible et simple pour analyser le GTH.

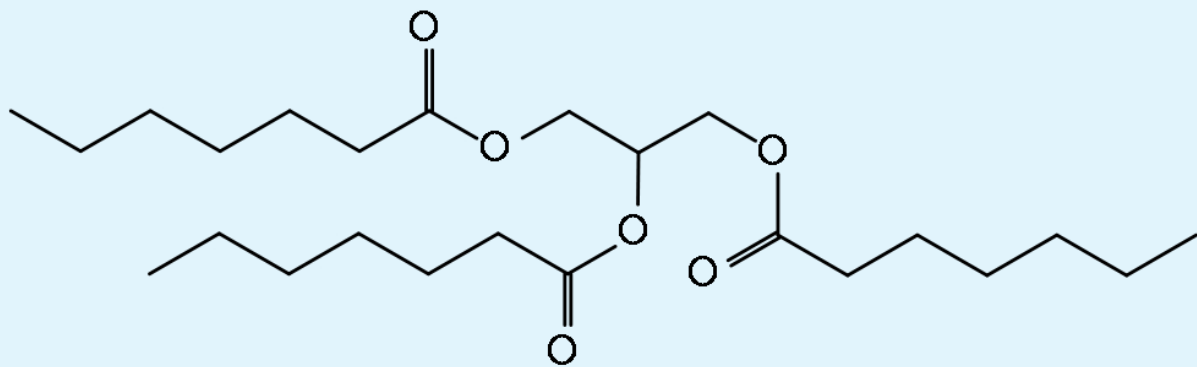


Figure 1: Formule développée du triheptanoate de glycérol

La méthode d'analyse a été développée par l'IRMM et est adaptée pour la détermination du GTH dans les farines et graisses animales. La méthode se compose de trois étapes de base : (i) extraction de la fraction grasse au moyen d'éther de pétrole (uniquement pour les farines animales) (ii) purification de la graisse extraite (pour les farines animales) ou de la graisse animale (pour les échantillons de graisse) et (iii) détermination de la concentration en GTH au moyen de la chromatographie en phase gazeuse. Pour la détection, on peut utiliser deux détecteurs, à savoir le Flame Ionisation Detector (FID) ou la spectrométrie de masse (MS). Le détecteur FID est uniquement adapté à la quantification du GTH dans les matières cibles (farines et graisses animales de catégories 1 et 2). Par contre, la spectrométrie de masse permet également de détecter l'absence de GTH dans les sous-produits animaux de catégorie 3.

Il ressort de la validation de l'IRMM, lors de laquelle différentes caractéristiques de performance (telles que la robustesse, la sensibilité, la précision (répétabilité et reproductibilité) et la justesse) ont été définies, que cette méthode est appropriée à l'objectif visé.

Après la mise au point de la méthode d'analyse pour la détermination du GTH, une étude d'implémentation a été mise en œuvre en collaboration avec différentes usines de fonte de graisses situées en Europe. Le but de cette étude était de vérifier si l'application du GTH comme marqueur dans les sous-produits animaux de catégories 1 et 2 était réalisable dans la pratique et dans des conditions réalistes. L'étude a été réalisée par l'IRMM et le CCL Research (Laboratoire central de coopération), en collaboration étroite avec la DG SANCO et l'EFRA (European Fat Processors and Renderers Association).

Pour chaque usine de fonte de graisses, le GTH s'est avéré être détectable à une concentration élevée dans les produits finaux (farines et graisses animales). La teneur en GTH se situait largement au-dessus de la limite de détection. Ces résultats démontrent que le GTH peut se mélanger complètement à la graisse, et ce tant pour le marquage de farines animales que de graisses. Une étude de stabilité a également mis en avant que le GTH est stable pendant au moins 58 semaines dans les farines animales, à température ambiante. On peut donc conclure des résultats de cette étude d'implémentation que le GTH est un marqueur adéquat et tout à fait utilisable dans la pratique pour les matières de catégories 1 et 2.

Sur base du rapport de cette étude, la Commission européenne a approuvé le 11 septembre 2007 l'utilisation du système basé sur le marqueur GTH (Commission européenne, 2007). Le Règlement 1432/2007 (Union européenne, 2007) a ensuite été publié le 5 décembre 2007, et est entré en vigueur le 1er juillet 2008. Selon ce règlement, les sous-produits animaux de catégories 1 et 2 doivent être marqués au GTH de façon permanente. Le marquage de telles matières garantit l'identification et la traçabilité des produits qui doivent être détruits et ne peuvent donc certainement plus se retrouver dans la chaîne alimentaire. Le risque de fraude se voit ainsi également éliminé. L'ajout de GTH doit se faire de telle manière que les produits transformés contiennent une concentration minimale de 250 mg de GTH par kg de graisse. De plus, le GTH doit être réparti de manière homogène dans la substance et il doit être ajouté après que les produits aient subi un traitement thermique préalable assainissant à une température à cœur d'au moins 80°C. Des expériences menées à l'échelle de laboratoire ont en effet montré que le GTH n'est pas stable dans les sous-produits animaux crus, où il se voit décomposé par des enzymes issues du tube digestif. Ces enzymes deviennent néanmoins inactives à partir du moment où les sous-produits animaux atteignent une température de 80°C. Le GTH n'est par conséquent pas ajouté au niveau des abattoirs, mais seulement dans les établissements de transformation. La figure 2 donne un exemple de processus de fonte de graisse. Le moment où est ajouté le GTH est signalé par une petite pipette.



Wet Rendering Process Batch, Natural fat, Pre-pressure

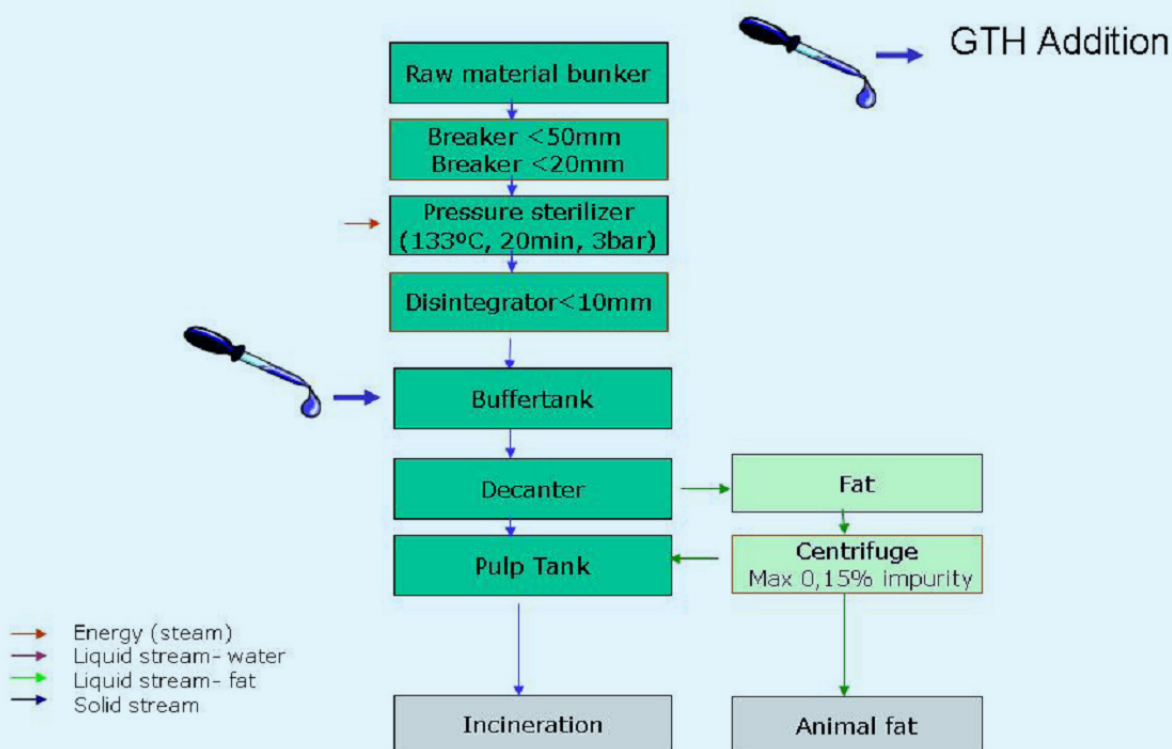


Figure 2: Présentation schématique d'un exemple de processus de fonte de graisses. L'étape d'ajout du GTH est indiquée au moyen d'une pipette.

Enfin, la méthode d'analyse a été validée à l'aide d'une étude inter-laboratoire, à laquelle le FLVVT (Laboratoire fédéral pour la Sécurité de la Chaîne alimentaire de Tervuren) a également pris part. Le but de cette étude consistait à définir les caractéristiques de performance de la méthode de détermination du GTH. L'étude a été réalisée par 20 laboratoires officiels de 13 États membres, de sorte que ces laboratoires puissent commencer à contrôler l'utilisation correcte du GTH par l'industrie de fonte des graisses immédiatement après l'achèvement de l'étude. Des valeurs acceptables ont été notées pour la précision et la justesse de la méthode. Il en a donc été conclu que la méthode d'analyse était appropriée au but visé.

De plus amples informations sur le GTH, la méthode d'analyse officielle et les rapports de l'étude d'implémentation et de l'étude inter-laboratoire peuvent être consultées sur le site internet de l'IRMM. (http://www.irmm.jrc.be/activities/marker_for_animal_by_products/Pages/index.aspx)

Eva Wevers, FLVVT
eva.wevers@favv.be

Les vitamines

Définition

Les vitamines sont des nutriments organiques essentiels qui, contrairement à d'autres nutriments (glucides, lipides, protéines), n'apportent ni énergie ni éléments de croissance. Elles sont pourtant indispensables au bon déroulement du métabolisme dans l'organisme. Les vitamines sont présentes dans un grand nombre de sources alimentaires naturelles. Il s'agit de micronutriments, c'est-à-dire des nutriments dont seule une petite quantité (quelques mg ou µg) doit être absorbée chaque jour par le biais de l'alimentation vu qu'elles ne sont pas synthétisées par l'organisme, ou le sont mais de manière insuffisante. À chaque vitamine correspond une "dose journalière recommandée" (DJR). La quantité réellement requise pour chaque individu est déterminée par différents facteurs, tels que l'âge, le sexe, l'environnement, l'état de santé et le stress. Une alimentation non équilibrée ou certaines affections peuvent mener à une carence en vitamines et à d'éventuelles maladies carencielles. L'ingestion de compléments alimentaires ou l'enrichissement de denrées alimentaires et d'aliments industriels pour animaux en vitamines permet d'éviter une carence chez l'homme et chez l'animal.

Classification et fonction

Les propriétés chimiques et physiologiques des vitamines sont très variées. Jusqu'à présent, nous avons connaissance de 13 vitamines, chaque vitamine représentant un groupe de composés organiques de structure similaire et d'activités biologiques variables, appelés vitamères. Les provitamines, elles, sont des précurseurs de vitamines, à savoir des composants naturellement présents qui sont transformés en 'vraies' vitamines dans l'organisme par l'action normale du métabolisme.

Les vitamines sont classifiées en deux groupes sur base de leurs propriétés de solubilité. Les vitamines liposolubles sont les vitamines A, D, E et K ainsi que 50 caroténoïdes environ. Le groupe des vitamines hydrosolubles comprend la vitamine C (acide ascorbique) et toutes les vitamines B, à savoir la thiamine (B1), la riboflavine (B2), la niacine (B3), l'acide pantothénique (B5), la pyridoxine (B6), la biotine (B8 ou H), l'acide folique (B11 ou B9) et la cyanocobalamine (B12). Les propriétés de solubilité déterminent également la distribution des vitamines dans différents groupes alimentaires et ont des conséquences directes sur les méthodes d'analyse appliquées. Les vitamines liposolubles se rencontrent principalement dans les aliments riches en graisse et peuvent être stockées dans les tissus graisseux et le foie. Les vitamines hydrosolubles B et C sont présentes dans toutes sortes d'aliments. L'organisme ne sait pas bien stocker ces vitamines (à l'exception de la vitamine B12), tout excédent est donc évacué de l'organisme par le biais de l'urine ou de la sueur.

Les vitamines sont des régulateurs de processus de synthèse et de dégradation et constituent les éléments structuraux des co-enzymes, hormones et autres substances. Elles jouent un rôle dans la croissance, la réparation et le bon fonctionnement de l'organisme et assument surtout une fonction catalytique. La plupart des vitamines hydrosolubles sont transformées in vivo en co-enzymes qui, en combinaison avec les enzymes métaboliques, jouent un rôle crucial dans le catabolisme des nutriments de manière à produire de l'énergie pour l'organisme. Certaines vitamines sont produites dans l'organisme, par l'action de bactéries présentes dans la flore intestinale ou dans la peau sous l'effet des rayons du soleil. Les végétaux ont la capacité de synthétiser eux-mêmes les vitamines, à l'exception de la vitamine B12 ; ils représentent par conséquent la source principale de ces nutriments essentiels. La plupart des vitamines sont des composés très instables qui sont rapidement décomposés en raison de leur sensibilité à la cuisson, à l'oxydation, aux rayonnements, à l'humidité, à l'activité de l'eau, au pH, aux enzymes cataboliques et aux effets catalytiques des métaux. Afin d'augmenter leur stabilité, des composés dérivés sont généralement utilisés en vue de l'ajout de vitamines dans des aliments pour animaux et denrées alimentaires.



Analyse des vitamines

Outre les bio-essais réalisés pour déterminer la valeur nutritionnelle réelle d'une vitamine dans un produit, on fait principalement appel à des techniques d'analyse *in vitro* pour l'analyse des aliments pour animaux et des denrées alimentaires enrichis, telles que les analyses microbiologiques ou les méthodes d'analyse physicochimiques (p.ex. HPLC). Les analyses physicochimiques permettent une quantification des composants principaux responsables de l'activité biologique et peuvent présenter un haut degré de précision.

La chromatographie en phase liquide à (ultra) haute performance ((U)HPLC) est pour l'instant la méthode de prédilection pour la détermination de la teneur en vitamines. L'HPLC peut être utilisée pendant la préparation de l'échantillon afin de purifier les extraits ou de séparer les composants et les quantifier. Des analyses microbiologiques ont été mises au point au début des années 1940 et constituent encore souvent les méthodes officielles pour la détermination de différentes vitamines B, mais ici aussi l'HPLC et la LC-MS sont en pleine progression. La procédure générale pour les analyses microbiologiques et physicochimiques peut être divisée en plusieurs étapes importantes : échantillonnage, extraction, purification éventuelle, titrage et calcul du résultat.

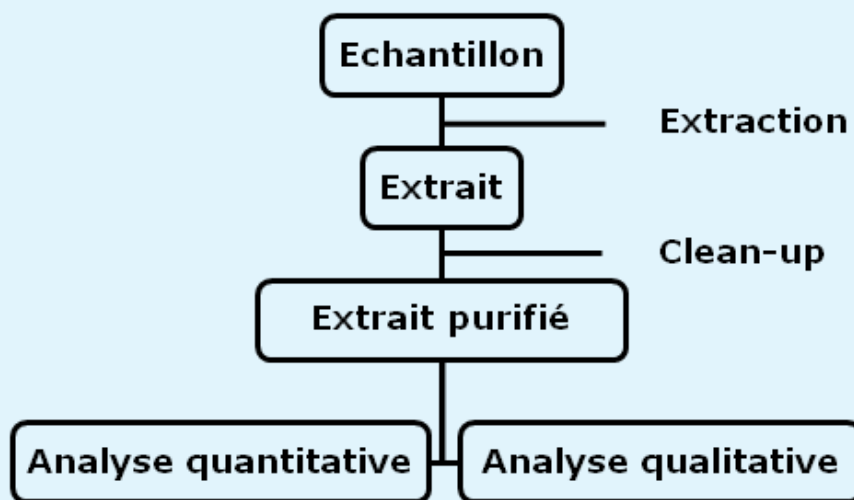


Figure 1 : Schéma général de la procédure d'analyse

Extraction des vitamines

Les analyses commencent par une extraction des vitamines de la matrice afin de permettre leur détermination. La méthode d'extraction choisie dépend du résultat requis, de la nature de la matrice, de la présence naturelle ou sous forme synthétique des vitamines, des composants interférents, de la résistance de la vitamine à l'égard de la chaleur et des valeurs extrêmes de pH. Elle dépend également de la sélectivité et de la spécificité de la méthode d'analyse utilisée. Pour la réussite de la détermination, il est essentiel que les vitamines soient extraites quantitativement de la matrice sous une forme qui peut être déterminée précisément au moyen de la technique d'analyse utilisée. Une procédure d'extraction efficace homogénéise et concentre l'échantillon, isole l'analyte de sa liaison avec la protéine, élimine autant que possible les substances interférentes connues et détruit l'activité enzymatique endogène. Les méthodes d'extraction des vitamines hors des matrices alimentaires sont entre autres l'hydrolyse acide ou alcaline (saponification), l'hydrolyse enzymatique, l'extraction directe par solvant et l'extraction en phase solide.

La chromatographie en phase liquide, une méthode adaptée ?

L'HPLC peut être utilisée pour la détermination des vitamines qui ont été ajoutées dans les denrées alimentaires et aliments pour animaux enrichis. La détermination des vitamines naturellement présentes au moyen de l'HPLC est plus complexe en raison des différents vitamères, des procédures d'extraction plus complexes sont par conséquent nécessaires afin de prendre les formes liées en considération. L'HPLC n'est pas suffisamment sensible pour une détermination précise des teneurs extrêmement basses en vitamine B12 et B8 dans l'alimentation. C'est également une technique très utilisée pour la détermination de la vitamine C, malgré la faible absorption de l'acide déhydroascorbique et son manque d'activité électrochimique. Elle ne garantit toutefois pas que l'on tienne compte de toutes les formes biologiquement actives d'une vitamine qui seraient déterminées lors d'une analyse microbiologique et, à cet égard, la spécificité inhérente à l'HPLC peut donner lieu à une sous-estimation de l'activité vitaminique totale.

L'utilisation de colonnes HPLC en phase inverse, qui conviennent à la fois aux phases mobiles 100 % organiques et aux phases mobiles 100% aqueuses, permettent la séparation des analytes fortement polaires en phase mobile aqueuse et celle des analytes hydrophobes en phase mobile organique. Elles conviennent par conséquent à la séparation tant des vitamines liposolubles que des vitamines hydrosolubles et rendent possible la détermination simultanée de certaines combinaisons de vitamines. Les méthodes récentes sont essentiellement ciblées sur la détermination simultanée rapide et efficace du plus grand nombre de vitamines possible dans le plus de matrices possible. Trouver une méthode d'extraction adéquate, éliminer les effets de matrice et optimiser les conditions de l'HPLC constituent néanmoins un grand défi pour la détermination simultanée des vitamines.

Les méthodes de détection les plus utilisées sont la détection UV et la détection par fluorescence, cette dernière présentant une plus grande sensibilité. La détection à l'aide d'une barrette à photodiodes offre la possibilité d'identifier des analytes via l'absorption UV sur différentes longueurs d'onde et de tester en même temps la pureté maximale. Un développement plus récent est l'utilisation de la LC-MS comme outil sélectif et sensible pour la détermination d'une ou de plusieurs vitamines dans l'alimentation.

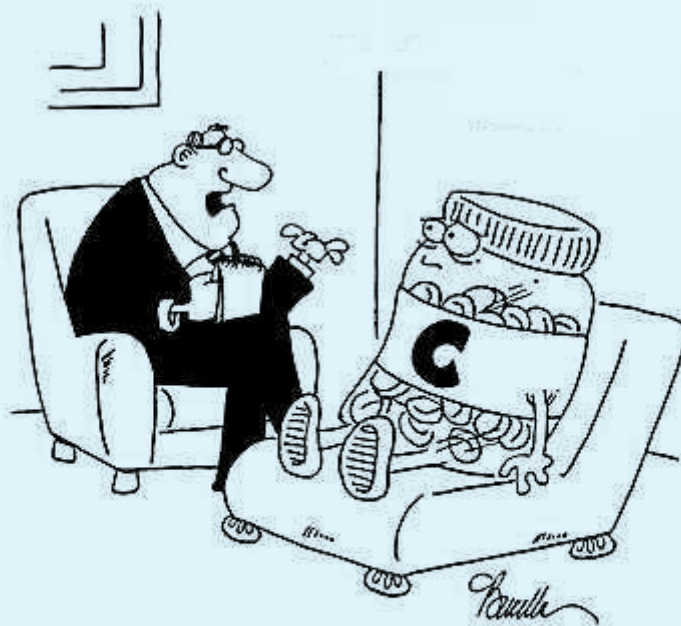


De beaux projets en perspective

Ces prochaines années, la législation européenne mettra de plus en plus l'accent sur la détermination précise des types de vitamines et des concentrations en vitamines présents dans les denrées alimentaires (compléments alimentaires, préparations pour nourrissons, aliments pour bébés, ...). L'instauration d'une réglementation plus stricte rend encore plus indispensable le développement de méthodes analytiques reconnues au niveau international et correctement validées présentant une haute exactitude et précision. Néanmoins, on ne sait pas clairement si les méthodes normalisées actuelles peuvent être utilisées pour la détermination de certaines vitamines dans des matrices données. Le développement de nouvelles méthodes d'analyse des vitamines est cependant un processus très lent, en particulier en ce qui concerne les vitamines hydrosolubles. Une harmonisation et/ou un élargissement des méthodes et matrices normalisées actuellement utilisées par les différentes organisations officielles serai(en)t déjà une première étape en vue de satisfaire à la nouvelle réglementation et de conserver une vue d'ensemble des méthodes disponibles.

Mieke Vanbrabant, FLVVT
mieke.vanbrabant@favv.be





"You have a fear of Thiamine, Riboflavin,
Niacin, etc.,...better known as a
Vitamin B Complex."

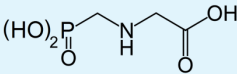


Le glyphosate dans tous ses états

S. Goscinny et V. Hanot
Institut Scientifique de Santé Publique
Unité Pesticides

Une molécule à succès

Depuis sa première introduction sur le marché en 1974, le glyphosate est aujourd'hui le composé phytosanitaire le plus utilisé dans le monde (un million de tonnes vendu en 2010). Sa popularité croissante est étroitement liée à son efficacité agronomique, son coût faible et, surtout, son profil toxicologique favorable (voir CV). Le principal produit de dégradation du glyphosate est l'acide aminométhylphosphonique (AMPA) qui possède les mêmes propriétés chimique et toxicologique que le parent. Dans les aliments, l'AMPA n'a été détecté que dans 2% des cas, ce qui explique que la limite maximale en résidus ne concerne que le glyphosate. A difficulté analytique égale, les méthodes pour la détermination du glyphosate sont aussi mises au point pour l'AMPA. Ceci permet d'avoir non seulement plus de données pour l'évaluation des risques mais également, en cas de changement futur de la définition du résidu, d'être prêt sans devoir passer par une phase de développement et de validation complémentaire.

| Glyphosate | |
|-------------------------|--|
| Curriculum Vitae |  |
| Propriétés | Chimiques C ₃ H ₈ NO ₃ P = N-(phosphonométhyl)glycine Masse molaire = 169,07 pKa : 0,78-2,29-5,96-10,98 acide organique faible solubilité dans l'eau : 12 g/L à 25°C |
| Mécanisme | D'action Inhibe l'enzyme 5-enolpyruvoyl-shikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) impliquée dans la voie métabolique de l'acide shikimique. Cette voie est absente chez les animaux, ce qui peut expliquer des DL ₅₀ élevées par voie orale : <ul style="list-style-type: none">• Chèvre femelle 3 530 mg/kg• Rat femelle 2 686 mg/kg |
| Utilisation | Agronomique Herbicide systémique à large spectre, ce qui lui confère une grande souplesse d'utilisation : sur tous les types de culture, et pour l'entretien des espaces urbains (espaces verts, jardins, routes, voies ferrées). Utilisation massive avec les cultures génétiquement modifiées |
| Toxicologie | Dégradation Modérément persistant dans le sol, ½ vie de 20 à 100 jours, il subit une dégradation microbienne qui le métabolise au final en dioxyde de carbone et en composés inorganiques simples. Toutefois, son utilisation massive remet en question le côté « relativement peu toxique » pour l'environnement. Exposition Peu soluble dans les graisses donc réduit les risques de bio-accumulation. Il est absorbé de façon incomplète (15 à 40 %) par voie orale. |

Une « Diva » en chimie analytique

Comparé aux autres herbicides, le glyphosate est le plus difficile à analyser. L'origine de ces difficultés vient de ses propriétés physico-chimiques qui compliquent chaque étape de l'analyse:

La préparation de l'échantillon

Le glyphosate est très polaire, soluble dans l'eau et insoluble dans les solvants organiques, ce qui limite les possibilités pour son extraction. L'utilisation de l'eau est de ce fait inévitable pour cette étape. Toutefois, dans l'extrait, on retrouve aussi tous les autres composés hydrosolubles de la matrice (sucres, acides aminés, sels...) qui vont interférer avec la détermination du glyphosate. Une étape de purification sur colonne est délicate à cause du caractère amphotère du glyphosate. Une purification de type extraction liquide-liquide est moins difficile en terme de rendement et est, de ce fait, l'option la plus répandue dans la littérature. Toutefois, cette dernière requiert plus de manipulation et allonge le temps d'analyse.

Séparation et détection

Non seulement ces composés sont très polaires et ioniques mais, de surcroît, ils ne possèdent pas de groupes chromophores permettant leur détection par fluorescence ou par absorption dans l'ultra-violet. A cette étape de l'analyse, il faut faire un choix difficile: dériver ou pas?

La technique de dérivation permet l'analyse de composés qui ne peuvent être directement analysés en chromatographie gazeuse (GC) et liquide (LC). Par réaction chimique, on greffe un agent (chromophore) sur une ou plusieurs portions de la molécule cible. Le composé dérivatisé présente des changements dans ses propriétés en faveur de son analyse. Dans le cas du glyphosate, la dérivation lui apporte un chromophore, réduit sa polarité et, en fonction du réactif de dérivation choisi, permet même son analyse en GC. Cette technique n'est pas très appréciée par les analystes car elle exige une optimisation de plusieurs paramètres (température, temps de réaction, concentration et pureté des réactifs, temps de manipulation du laborantin). Si l'on désire s'affranchir de cette lourde étape, il reste des options intéressantes en chromatographie liquide, telles que la chromatographie d'interactions hydrophiles (HILIC), la chromatographie d'échange d'ions (IC) ou d'appariement d'ions adaptées aux molécules très polaires et ioniques. Cependant, la robustesse de ces techniques de séparation dépend largement d'une purification poussée ou exige un facteur de dilution de l'extrait élevé et donc un système de détection très sensible. La dérivation ou l'analyse directe présente chacune des avantages et des inconvénients. Le choix d'une technique devra se faire de manière rationnelle si l'on veut aboutir à une méthode rentable. Dans les deux cas, une détection par spectrométrie de masse est possible et recommandée pour éviter les problèmes d'interférences et de sensibilité obtenus avec d'autres détecteurs (UV, électrochimique...)



Les coulisses d'une méthode

L'analyse du glyphosate dans les céréales est obligatoire depuis le début de l'année 2011 pour tous les laboratoires impliqués dans le plan de contrôle européen. Cette obligation se traduit par la nécessité de développer une méthode d'analyse robuste et validée qui devra facilement s'intégrer dans les analyses de routine du laboratoire. C'est dans ce cadre qu'une méthode d'analyse du glyphosate et de son métabolite l'AMPA a été mise au point à l'ISP en collaboration avec le laboratoire AGES (L'Agence Autrichienne pour la Santé et la Sécurité Alimentaire). Les méthodes d'analyse directes (non dérivatisées) sont peut être très attirantes puisqu'elles ne demandent pas de gérer l'étape de dérivatisation, cependant, elles imposent des changements chromatographiques (phases mobiles, colonnes, temps de mise en fonctionnement) qui ne sont pas nécessairement compatibles avec les analyses de routine. Nous avons favorisé un protocole qui permet de garder les conditions instrumentales des analyses multi-résidus (colonne C18 classique, et phases mobiles eau-méthanol tamponnées avec de l'acétate d'ammonium à un $\text{pH} \pm 6$). C'est donc l'option comprenant une étape de dérivatisation qui a été choisie. Le réactif choisi est le 9-fluorenylméthyl-chloroformate (FMOC) qui permet, grâce à son groupement hydrophobe, de réduire la polarité de la molécule cible et donc d'augmenter sa rétention sur une colonne à phase inverse de type C18 (voir chromatogramme) ainsi que la masse molaire, ce qui va faciliter la détection en MS/MS. Le FMOC va se placer sur la fonction amine en libérant une molécule d'HCl. La réaction doit avoir lieu en milieu basique (on utilise un tampon borate-Na $\text{pH}=9$) pour neutraliser l'acide formé et favoriser le sens de la réaction vers la formation de glyphosate-FMOC. Malheureusement, le FMOC n'est pas spécifique au glyphosate mais réagit avec toutes les fonctions amines et fortement avec l'eau. La concentration en réactif était déterminante afin d'obtenir une méthode robuste, c'est pourquoi la concentration choisie (1 mg/ml) est largement en excès et garantit:

- que le surrogat et les composés cibles ne sont pas en compétition et réagissent avec le FMOC de manière équivalente;
- la réaction avec l'eau et les amines de l'extrait n'est pas délétère pour les composés cibles.

L'excédent de réactif est éliminé par lavage avec du dichlorométhane et le résultat de la réaction est directement filtré avant d'être injecté.

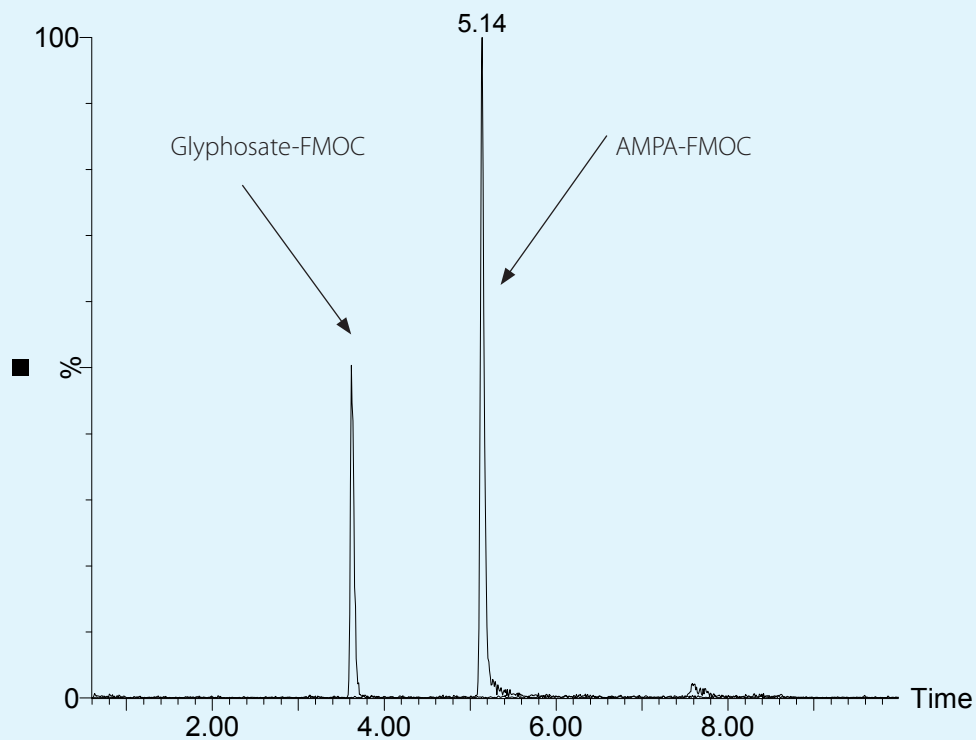


Figure 1: Chromatogramme UPLC-ESI⁺-MS/MS pour le glyphosate-FMOC et AMPA-FMOC d'une solution de calibration à 100 µg/kg

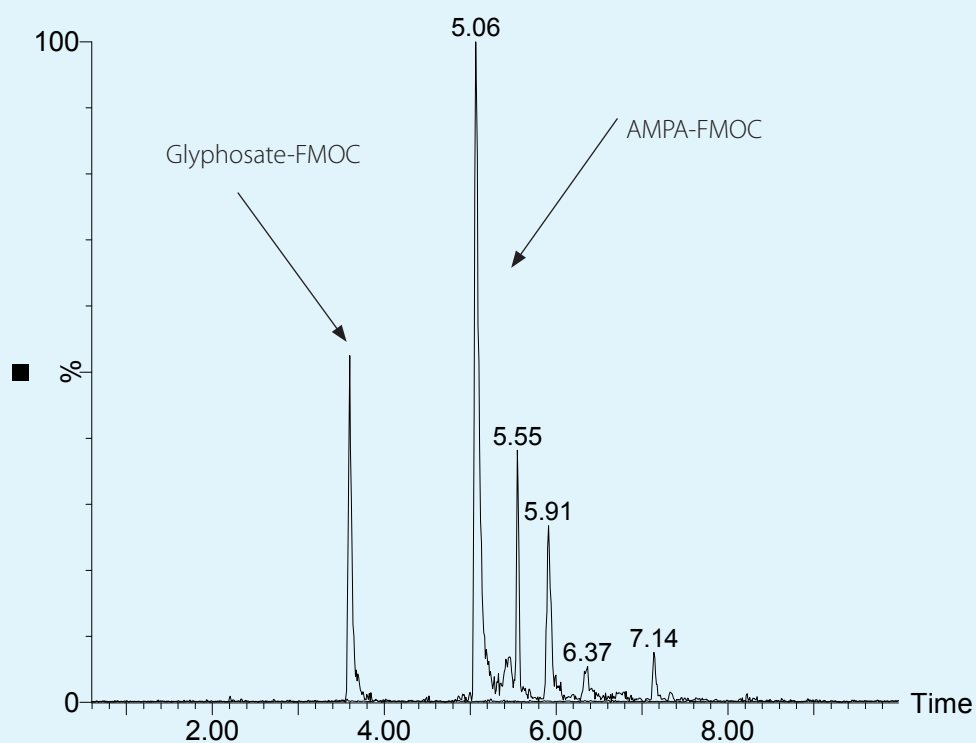


Figure 2: Chromatogramme UPLC-ESI⁺-MS/MS pour le glyphosate-FMOC et AMPA-FMOC d'un échantillon d'avoine spiké à 10 x LOQ (200 µg/kg)



Une méthode « sur mesure »

La méthode a été validée en respectant les lignes directrices du document SANCO/10684/2009. Il en résulte que :

- aucun effet de matrice n'est présent, la courbe d'étalonnage est donc préparée en dérivatisant les composés hors matrice et couvre une gamme de concentrations allant de 20 µg/kg à 500 µg/kg;
- les conditions de dérivatisation sont bien adaptées puisqu'on obtient des rendements à la limite de quantification (20 µg/kg) de 101.1 % (RSD de 6.9 %) et 112.9 % (RSD de 11.9 %) pour le glyphosate et l'AMPA respectivement.

La détermination du glyphosate à l'état de trace est incontestablement compliquée. Toutefois, si le choix analytique est judicieux, on arrive à de très bons résultats. Dans notre cas, le choix de quantifier par dilution isotopique a permis d'obtenir de bons rendements apparents sans se soucier des pertes éventuelles lors de l'étape rapide (1 min) d'extraction-purification simultanée. La dérivatisation est un succès puisqu'elle permet d'insérer facilement l'analyse du glyphosate à la suite des analyses de routine sans changement au niveau instrumental, ce qui procure un gain de temps appréciable.

Severine.Goscinny@wiv-isp.be

Vincent.Hanot@wiv-isp.be

Risques de migration dans les théières traditionnelles en métal



L'usage d'une théière traditionnelle a provoqué à Bruxelles une intoxication par le plomb impliquant une famille entière. Différents prélèvements d'échantillons de théières ont été réalisés par l'ISP (Institut Scientifique de Santé Publique) en collaboration avec le Laboratoire intercommunal Bruxellois de chimie et bactériologie et l'AFSCA (Agence Fédérale pour la Sécurité de la Chaîne Alimentaire) qui a procédé à des retraits de marchés.

Les concentrations en métaux toxiques (Plomb et Nickel) migrant dans le thé peuvent s'avérer particulièrement alarmantes et contribuer significativement à des risques d'intoxications graves. Au vu des valeurs mesurées, il est certain que l'utilisation de ces théières peut conduire à des cas de saturnisme aigus.

En effet, les dépassements des valeurs toxicologiques de référence pour le plomb et le nickel sont très inquiétants. Bien que les hypothèses posées ne se veulent pas maximalistes, elles montrent la possibilité de dépasser de 90 fois la Dose Journalière Admissible (DJA) pour le plomb.

Mais des facteurs comme un séjour plus long (migration jusqu'à 9 fois plus élevée après 1 heure plutôt que 15 min.) pourraient aggraver encore la problématique.

L'usage de citron s'avère également aggravante puisque les niveaux de migration peuvent s'avérer plus de 10 fois plus importants qu'avec un thé nature.

On remarquera également l'attention soutenue à avoir pour des populations plus à risques comme les enfants (dont cas cité plus haut) puisque ces derniers sont davantage sensibles que les adultes à l'intoxication par le plomb (assimilation 5 fois plus importante).



Tableau 1:

Le tableau suivant reprend, pour les théières analysées, la concentration en plomb retrouvée, l'ingestion sur base de l'hypothèse d'une consommation de 4 tasses par jour et le pourcentage de la Dose journalière Admissible (DJA) que cette consommation engendre.

| Plomb (hypothèse 4 tasses/jour [800 mL]) et séjour de 15 minutes dans la théière | | | | |
|--|---------------------------------------|-------|------|-------------|
| n° | Nature du thé préparé dans la théière | mg/L | mg/J | % DJA |
| Théière n°1 | Thé nature | 1,74 | 1,4 | 650 |
| Théière n°2 | Thé nature | 0,84 | 0,7 | 314 |
| Théière n°3 | Thé nature | 0,71 | 0,6 | 264 |
| Théière n°4 | Thé nature | 0,18 | 0,1 | 66 |
| Théière n°5 | Thé nature | 1,19 | 1,0 | 444 |
| Théière n°6 | Thé nature | 0,10 | 0,1 | 36 |
| Théière n°7 | Thé nature | 1,49 | 1,2 | 557 |
| Théière n°8 | Thé nature | 0,32 | 0,3 | 118 |
| Théière n°9 | Thé nature | 0,20 | 0,2 | 73 |
| Théière n°10 | Thé nature | 0,34 | 0,3 | 129 |
| Théière n°11 | Thé nature | 4,90 | 3,9 | 1830 |
| Théière n°1 | Thé citron | 23,97 | 19,2 | 8961 |
| Théière n°2 | Thé citron | 9,10 | 7,3 | 3400 |
| Théière n°3 | Thé citron | 8,30 | 6,6 | 3101 |
| Théière n°4 | Thé citron | 10,21 | 8,2 | 3816 |
| Théière n°5 | Thé citron | 13,12 | 10,5 | 4905 |
| Théière n°6 | Thé citron | 1,07 | 0,9 | 399 |
| Théière n°7 | Thé citron | 16,12 | 12,9 | 6027 |
| Théière n°8 | Thé citron | 0,38 | 0,3 | 142 |
| Théière n°9 | Thé citron | 0,42 | 0,3 | 157 |
| Théière n°10 | Thé citron | 0,65 | 0,5 | 243 |
| Théière n°11 | Thé citron | 17,60 | 14,1 | 6578 |

Dans un avis conjoint (Sci Com 06-2011 et CSS N°8726) approuvé par le Comité scientifique de l'AFSCA le 24 juin 2011 et validé par le Collège du Conseil Supérieur de la Santé (CSS) le 6 juillet 2011, il est conclu ceci : « Bien que seule une étude approfondie, incluant un biomonitoring, puisse refléter sans équivoque le risque lié à l'utilisation de théières traditionnelles en laiton, il est recommandé de déconseiller l'utilisation de telles théières et d'interdire leur vente. De plus, outre ce type de théières, d'autres matériaux de contact (pots ou plats en céramique, p.ex. tajines) dont l'usage est plutôt défini culturellement s'avèrent également être des facteurs de risque importants au niveau de l'exposition aux éléments métalliques (et au plomb en particulier).

Par conséquent, une communication ciblée soulignant les risques de tels matériaux de contact est formellement recommandée. En outre, le programme de contrôle de l'AFSCA doit prendre en considération la migration d'éléments métalliques (plomb, mais aussi autres métaux tels le nickel) en provenance d'ustensiles artisanaux similaires (p.ex. laiton, fonte émaillée) et de matériaux en céramique entrant en contact avec des denrées alimentaires.

Fabien Bolle, ISP
fabien.bolle@wiv-isp.be

Les allergies alimentaires

Un problème de santé publique

L'allergie alimentaire est un problème de santé publique important qui progresse depuis des années. Elle touche de 2 à 3 % de la population mondiale et la prévalence atteint 6 à 8 % chez les enfants. On assiste, de plus, à une augmentation de la fréquence et de la sévérité des réactions au cours des dix dernières années (Conseil Supérieur de la Santé, publication N°8513). Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, les allergies alimentaires seraient le 4ème plus gros problème de santé publique.

Les allergies alimentaires doivent être distinguées des intolérances alimentaires telles que l'intolérance au lactose ou la maladie cœliaque. Les allergies sont des réactions immunologiques anormales IgE-dépendantes envers un aliment. Les intolérances sont soit des réactions non-immunologiques et dépendantes de la susceptibilité personnelle comme pour le lactose (chez les personnes ayant une déficience en lactase), soit des réactions immunologiques mais non IgE-dépendantes comme pour la maladie cœliaque ou intolérance au gluten.

Les symptômes sont variés (urticaire, diarrhée, constipation, etc.) et peuvent être sévères comme des problèmes respiratoires, cardio-vasculaires ou un choc anaphylactique. Des cas de décès sont décrits suite à une réaction allergique. Des quantités infimes d'allergènes, de l'ordre du mg de protéines, peuvent provoquer des réactions chez les patients sensibles. Seule une éviction complète de l'aliment allergène permet aux patients d'éviter une réaction allergique. Il est donc primordial pour eux d'avoir un étiquetage complet et correct de ce qu'ils mangent. La directive européenne 2007/68/EC rend obligatoire l'étiquetage de 14 ingrédients allergènes pour les produits préemballés :

- les céréales contenant du gluten (à savoir blé, seigle, orge, avoine, épeautre, kamut ou leurs souches hybridées)
- les crustacés
- les œufs
- les poissons
- l'arachide
- le soja
- le lait
- les fruits à coque (à savoir amandes (*Amygdalus communis* L.), noisettes (*Corylus avellana*), noix (*Juglans regia*), noix de cajou (*Anacardium occidentale*), noix de pécan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch], noix du Brésil (*Bertholletia excelsa*), pistaches (*Pistacia vera*), noix de Macadamia et noix du Queensland (*Macadamia ternifolia*)
- le céleri
- la moutarde
- le sésame
- les mollusques
- le lupin
- les sulfites

et les produits dérivés de ces aliments (sauf quelques exemptions).

Cette législation concerne les allergènes introduits intentionnellement dans le produit. En effet, des allergènes peuvent être ajoutés de manière fortuite suite à des contaminations croisées entre les chaînes de production, par exemple par les matières premières ou via le personnel. Ces allergènes cachés représentent un risque pour le consommateur allergique. Afin d'évaluer la présence de ces allergènes, il est indispensable de disposer d'outils analytiques fiables et validés.



Les méthodes d'analyse

Deux techniques principales d'analyse sont actuellement utilisées pour la détection des allergènes : la PCR (Polymerase Chain Reaction) et les méthodes immuno-chimiques telles que l'ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) ou le LFD (Lateral Flow Device). Le tableau 1 montre une comparaison de ces deux techniques. La PCR est basée sur la détection d'ADN spécifique d'allergène dans le produit testé. Cette technique présente l'avantage d'être très spécifique. Cependant, des produits hautement raffinés contenant encore de l'ADN mais ne contenant plus de protéines seront détectés positifs alors qu'ils ne présentent plus de risque pour le consommateur allergique. De plus, certains aliments comme le lait et les œufs et les extraits d'aliments contiennent une très faible quantité d'ADN par rapport à la quantité de protéines. Ils ne seront donc pas détectés par la PCR.

Les méthodes immuno-chimiques sont basées sur l'interaction entre des anticorps et leurs antigènes, dans ce cas-ci les protéines des aliments allergènes. L'ELISA est la méthode la plus employée actuellement pour la détection des allergènes. Elle est simple, rapide, sensible (de l'ordre du mg/kg) et spécifique. Différentes approches ont été choisies dans le développement des méthodes ELISA pour les allergènes. Les anticorps sont dirigés soit contre des protéines spécifiques ayant ou non un potentiel allergisant, soit contre des extraits de protéines solubles. Contrairement à la détection de l'ADN, la détection des protéines peut être interprétée en risque potentiel pour le consommateur allergique. Cependant, certaines protéines sont sensibles au traitement lors de la fabrication (cuisson, stérilisation, fermentation) et peuvent être partiellement dégradées ou modifiées. Elles ne sont alors plus détectées par l'anticorps du test bien qu'elles puissent garder leur potentiel allergénique, voire l'augmenter. Des néo-allergènes peuvent également être produits lors de la transformation alimentaire comme cela a été décrit lors de la torréfaction des arachides. Un autre problème des méthodes immuno-chimiques est la capacité de l'anticorps à reconnaître des motifs protéiques semblables à la protéine cible. On parle alors de réactivité croisée pouvant entraîner des faux résultats positifs. Cela peut être le cas par exemple dans la famille des fruits à coques qui possèdent des protéines homologues.

Les LFD sont des tests très rapides (5 - 10 min). En cas de présence de l'allergène dans l'échantillon, une bande colorée apparaît sur la tige. Actuellement, ces tests posent des problèmes dans le contrôle des allergènes dans les denrées alimentaires suite à de nombreux résultats faux positifs et à un manque de reproductibilité.

L'analyse par spectrométrie de masse (MS) est de plus en plus décrite dans la littérature pour faire face aux désavantages des deux autres méthodes : spécificité, ciblage des protéines allergisantes, possibilité d'analyser plusieurs allergènes en même temps, etc. Après extraction, les protéines sont digérées par une enzyme (majoritairement la trypsine) formant ainsi des peptides. Ceux-ci sont alors séparés par chromatographie et identifiés par le spectromètre de masse. L'efficacité d'extraction et l'interférence de la matrice sont deux paramètres limitant la sensibilité de cette technique. De plus, cette technique nécessite du matériel coûteux et du personnel hautement qualifié. Elle n'est donc pas encore utilisée en routine.

Le manque de données

Actuellement, très peu de données de validations sont disponibles pour comparer les résultats obtenus avec ces méthodes. Ceci est certainement dû au manque de protocoles de validation harmonisés au niveau international et de matériaux de référence reconnus. En effet, les standards sont développés par les équipes de recherche et sont spécifiques au test utilisé. Un protocole de validation harmonisé a été publié pour les méthodes de détection des allergènes par ELISA (Abbott et al., 2010). Il préconise l'utilisation de standards de référence et de matériaux de référence supplémentés. Cependant, un matériel parfaitement représentatif est rare. Le profil protéique des aliments allergènes varient en fonction de l'espèce, des conditions climatiques, de l'endroit de culture, des processus

de transformation, etc. De plus, en fonction de la matrice, l'allergène peut s'y retrouver brut (poudre de lait dans une poudre de lait de soja) ou transformé (poudre de lait dans une pâte à pain avant la cuisson). Plusieurs projets internationaux (MoniQA, Europrevall) ont pour objectif de développer ces matériaux modèles représentatifs des contaminations croisées qui pourraient avoir lieu (Dumont et al., 2010). Les résultats des validations interlaboratoires sur base du protocole harmonisé devraient prochainement être publiés afin de pouvoir comparer les méthodes ELISA utilisées.

Conclusions

Des avancées importantes ont été faites ces dernières années dans le domaine des allergies alimentaires tant sur le plan clinique que sur l'évaluation au moyen d'outils analytiques, et la gestion du risque de contaminations croisées dans l'industrie agro-alimentaire.

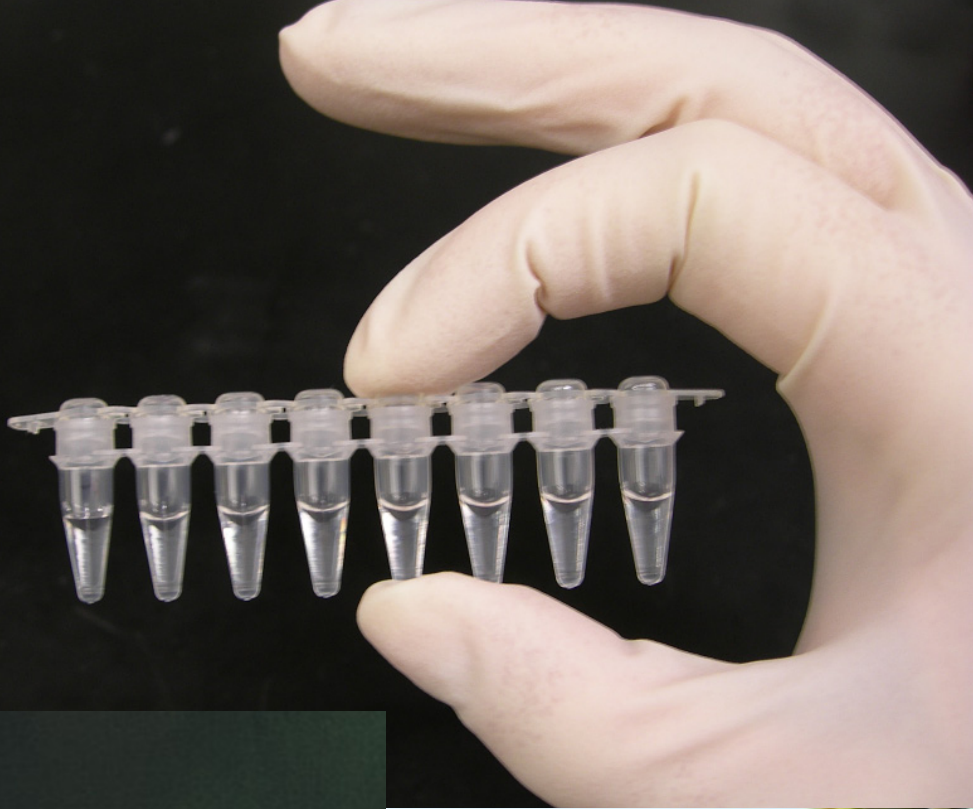
De nombreuses recherches sont encore nécessaires entre autres dans la détermination des limites de détection des méthodes analytiques en fonction des seuils de sensibilité clinique et dans l'interprétation et la corrélation des résultats donnés par des méthodes et des techniques différentes. L'AFSCA a donc désigné le CER Groupe et l'ILVO-T&V comme Laboratoire National de Référence dont les tâches principales seront de répondre à ces questions.

Tableau 1 : Comparaison des deux techniques principales d'analyse des allergènes. (Kerbach et al., 2009)

| | Immunochimique | PCR |
|------------------------|---|--|
| Détection | Protéines | ADN |
| Spécificité | Réactivités croisées possibles | Très spécifique |
| Sensibilité | De l'ordre de 1 mg/kg | De l'ordre de 10 mg/kg |
| Manipulation | Simple et rapide | Plus laborieux |
| Modification du signal | Variabilité biologique Variabilité climatique Efficacité d'extraction Modification (glycosylation, phosphorylation, etc.) suite aux traitements lors de la production Effet matrice | Génotype stable Efficacité d'extraction ADN stable aux hautes températures mais peut se fragmenter au faible pH Effet matrice - Inhibiteurs de la PCR dans la matrice |

Références :

- Kerbach S., Alldrick A.J., Crevel R.W.R., Dömötör L., DunnGalvin A., Mills E.N.C., Pfaff S., Poms R.E., Popping B., Tömösközi S. (2009) Managing food allergens in the food supply chain – viewed from different stakeholders perspectives. *Qual. Assurance & Safety of Crops & Foods* 1(1), 50-60
- Abbott M., Hayward S., Ross W., Godefroy S.B., Ulberth F., Van Hengel A.J., Roberts J., Akiyama H., Popping B., Yeung J.M., Wehling P., Taylor S.L., Poms R.E., Delahaut P. (2010) Validation procedures for quantitative food allergen ELISA methods: community guidance and best practices. *J AOAC Int* 93(2), 442-450
- Dumont, V., Kerbach, S., Poms, R., Johnson, P., Mills, C., Popping, B., Tömösközi, S. and Delahaut, P. (2010), Development of milk and egg incurred reference materials for the validation of food allergen detection methods. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 2(4), 208–215.





LNR-OGM : Projet de recherche « GMOseek (2009-2011) pour la détection d'OGM

IPH: Sylvia Broeders, Elodie Barbau-Piednoir, Guillaume Mbongolo Mbella, Nina Papazova, Antoine Pouppez et Nancy Roosens

ILVO: Isabel Taverniers et Marc De Loose

CRA-W: Frédéric Debode, Gilbert Berben et Eric Janssen

Introduction

Le projet GMOseek (SAFEFOODERA: "Food Safety – forming a European platform for protecting consumers against health risks") a été financé par la Commission européenne sous la « ERA-NET platform for protecting consumers against health risks » et s'est étalé du 1/06/2009 au 31/05/2011. Il se composait de six partenaires européens de quatre États membres différents : le Centre Wallon de Recherches Agronomiques (CRA-W, BE), l'Instituut voor Landbouw- en Visserijonderzoek (ILVO, BE), l'Institut scientifique de Santé Publique (ISP-WIV, BE), le Bayerische Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL, DE), le Joint Research Centre – Institute for Health and Consumer Protection (JRC-IHCP, IT) et le Nacionalni Inštitut za Biologijo (NIB, SI). Les trois laboratoires belges qui ont pris part au projet constituent de plus le Laboratoire national de référence pour organismes génétiquement modifiés (LNR-OGM). Le projet consistait en différents work packages (WP) et chaque laboratoire a participé à au moins 2 work packages.

Le projet traitait de la détection d'organismes génétiquement modifiés (OGM). Vu la législation considérable concernant les OGM, l'augmentation rapide du nombre d'OGM autorisés commercialisés ainsi que le risque croissant de présence d'OGM non autorisés (UGM), il est nécessaire de développer de nouvelles techniques de dépistage et d'affiner celles qui existent déjà. Les principaux résultats du projet étaient :

- L'élaboration d'une base de données rassemblant toutes les informations sur les événements GM existants.
- L'établissement d'un système bioinformatique permettant de sélectionner un nombre maximum d'événements GM autorisés par l'UE, sur base du screening d'une série optimale d'éléments génétiques.
- Le développement et la validation en interne des méthodes de screening SYBRGreen qPCR.
- Le développement et la validation en interne de méthodes de screening TaqMan qPCR.
- Le développement et la validation en interne d'une méthode de screening pentaplex qPCR.
- Le transfert des nouvelles méthodes de screening qPCR à un laboratoire partenaire.
- La rédaction d'un document concernant la validation des directives pour méthodes qualitatives qPCR.

Vous trouverez ci-après un bref aperçu du travail réalisé par les trois laboratoires belges LNR-OGM.

Institut scientifique de Santé publique (ISP-WIV)

Le labo OGM de l'unité Plateforme biotechnologie et biologie moléculaire de l'ISP-WIV a été impliqué dans le projet GMOseek au niveau des work packages WP2 et WP4.

Pour le WP2, le travail du laboratoire consistait en l'extraction et la caractérisation de l'ADN génomique (gDNA). Du matériel de référence certifié a été acheté et l'ADNg a été isolé en utilisant des méthodes d'extraction appliquées au niveau européen. Le laboratoire a pu démontrer que l'ADN extrait de différents matériaux était suffisant pour couvrir les besoins des laboratoires partenaires afin de développer leurs méthodes, qu'il était de bonne qualité et qu'il n'y avait aucune inhibition. Le matériel ADNg extrait a été distribué aux partenaires selon leurs besoins. De plus, un plasmide a été construit pour chaque méthode développée et validée par le laboratoire OGM.

Dans le WP4, le laboratoire OGM a développé et validé trois nouvelles méthodes de screening ciblant les éléments génétiques pNOS, pFMV et Cry3Bb qui sont présents dans différents événements GM. Ces méthodes permettent de couvrir plus d'événements GM et d'accroître le pouvoir de discrimination du système 'Combinatory SYBRGreen qPCR screening' (CoSYPS) précédemment validé et breveté. Le système permet de déterminer quel événement GM pourrait éventuellement être présent dans un échantillon à l'aide d'une combinaison d'éléments génétiques et il est utilisé pour l'analyse de routine d'échantillons food et feed au laboratoire OGM sous accréditation ISO 17025. Pour chaque nouveau marqueur génétique, le laboratoire OGM pouvait démontrer que les paramètres devant être évalués au cours de la validation interne se trouvaient dans les limites des critères d'acceptation. Toutes les informations ont été rassemblées dans un dossier de validation. Lors d'une dernière étape, les trois méthodes ont été transférées au laboratoire partenaire JRC-IHCP avec le matériel nécessaire et le protocole à suivre. La comparaison des résultats des deux laboratoires a démontré la reproductibilité des trois méthodes, ce qui est important vu l'harmonisation des méthodes de détection vers laquelle tend l'UE. Finalement, on a pu conclure que les trois nouvelles méthodes de screening étaient propres à la détection d'OGM dans des échantillons food et feed et pouvaient être intégrées au système CoSYPS permettant une détection OGM rentable et faisant gagner du temps.

Instituut voor Landbouw- en Visserijonderzoek (ILVO)

L'ILVO a contribué à trois work packages du projet GMOseek : WP1 sur la bioinformatique, WP3 sur les méthodes d'hybridation sur base de l'ADN et WP4 sur le matériel de référence et les Directives pour validations.

Dans le WP1, une banque de données « matrice OGM » interne contenant des informations pertinentes sur tous les événements GM existants dans le monde a été constituée. La vérification et l'entretien réguliers de cette banque de données constituaient l'une des tâches pour lesquelles l'ILVO était activement impliqué. Tous les six mois, tous les événements GM (enregistrements) dans la banque de données étaient vérifiés quant à leur exhaustivité et leur exactitude, les erreurs étaient indiquées et des données novel sur les événements GM ou événements GM novel étaient ajoutés dans la banque de données. En outre, cette banque de données constituait la base pour le développement d'outils bioinformatiques novel, utiles pour la sélection et l'ébauche de méthodologies de screening OGM en guise de première étape pour les procédures de test OGM officielles des laboratoires. La tâche du WP3 intitulée 'NAIMA platforms for multiplex screening on microarray' visait l'optimisation et l'évaluation de la technologie de screening NASBA-Integrated Multiplex Amplification (NAIMA) développée par NIB (Ljubljana, Slovénie). Après optimisation et validation interne réalisées chez NIB, l'ILVO a fait fonction de laboratoire de transfert pour la poursuite du test de la méthode hexaplex. L'ILVO a réalisé des réactions d'amplification (NASBA) et d'hybridation des réactions sur des plaques de puces à ADN, en utilisant le matériel et en suivant les protocoles précis de NIB. Toutefois, les puces ont été renvoyées à NIB afin d'être scannées et soumises à une analyse des données. Sur base de la faible robustesse ainsi que du transfert et de l'implémentation difficiles de la technologie en générale, la plateforme NAIMA multiplex n'a pas été considérée comme pertinente pour les tests inter laboratoires ultérieurs.



Centre Wallon de Recherches Agronomiques (CRA-W)

L'unité de traçabilité et d'authentification du CRA-W a contribué au succès du projet par son implication dans les WP1, 2 et 4 (développement de matériel de référence plasmide).

Le WP1 du projet consistait en la construction d'une matrice OGM en récoltant toutes les informations sur les gènes promoteurs et terminateurs utilisés dans des constituants GM. Le CRA-W a apporté dans la matrice les informations en sa possession et a participé à la vérification théorique et pratique des informations. Il a également développé des outils simples basés sur Excel pour faciliter la recherche d'informations dans la matrice ou pour le soutien décisionnel. Cet outil sera gratuitement accessible et sera très utile pour le contrôle ou pour les laboratoires de référence.

Le but du WP2 était de développer de nouvelles méthodes de screening. A cet effet, le CRA-W a développé de nouvelles méthodes de screening sur PCR en temps réel en utilisant des sondes TaqMan. Deux méthodes ciblant le promoteur du maïs Ubiquitin (pUbi) et le terminateur E9 du pois (tE9) ont été développées et validées en interne en tenant compte des critères d'acceptation tels que la spécificité, la sensibilité, la limite de détection, l'efficacité d'amplification, les taux de résultats faux positifs et faux-négatifs. Les méthodes pUbi et tE9 ont été transférées avec succès au laboratoire LGL pour évaluation. D'autre part, le CRA-W a évalué les méthodes simplex (p35S-nptII junction) et multiplex (duplex PAT/bar, triplex p35S/tNOS/CTP2-CP4-EPSPS, pentaplex PAT/bar/ p35S/tNOS/CTP2-CP4-EPSPS) conçues par LGL.

Deux méthodes additionnelles ont été développées au CRA-W et plusieurs critères d'acceptation ont été évalués. Afin d'éviter des résultats faux-positifs avec la cible tE9 en raison de la présence de pois dans un produit alimentaire (le terminateur tE9 provenant de ceux-ci), une cible spécifique pour la détection des pois a été développée. Un dernier objectif de screening pour les gènes Cry1Ab a également été créé et les variations de séquence de cette cible ont été étudiées dans les différents événements GM pour lesquels du matériel de référence était disponible.

Tous les partenaires

Les trois laboratoires LNR-OGM et les trois autres partenaires étaient impliqués dans le WP4 sur l'établissement de directives générales pour la validation de méthodes multiplex qualitatives pour les tests OGM. Sur base de directives officielles d'IUPAC, ISO et du Codex Alimentarius, un projet de document a été établi en ce qui concerne les exigences convenues pour le développement de méthodes et la validation interne d'une méthode de screening des OGM. Il a en outre été convenu que ces critères doivent être remplis avant qu'une méthode n'évolue jusqu'à une validation complète au moyen d'une étude comparative inter-laboratoire officielle.



Les participants au projet

Sylvia.Broeders@wiv-isp.be
isabel.taverniers@ilvo.vlaanderen.be
Debode@cra.wallonie.be



Vers une plus grande collaboration européenne en matière de quarantaine végétale

T. Olivier, A. Chandelier et S. Steyer
CRA-W: Unité Biologie des nuisibles et biovigilance

Bien que l'Union Européenne dispose d'une réglementation commune de protection contre l'introduction d'organismes nuisibles aux végétaux et produits végétaux depuis 1976, l'application harmonieuse de la réglementation au sein des différents Etats membres reste toujours, à l'heure actuelle, une gageure. En effet, cette harmonisation se heurte à plusieurs obstacles qui sont autant de défis pour les différents acteurs impliqués dans le domaine de la quarantaine végétale. Citons, de manière non exhaustive : l'absence d'un laboratoire communautaire de référence pour la quarantaine végétale, la difficulté à adapter la réglementation aux maladies et ravageurs émergents, la pression du commerce mondialisé, le changement climatique, le défi de l'intégration des nouveaux Etats membres mais, surtout, l'absence d'analyse de risque phytosanitaire (ARP – PRA Pest Risk Analysis) au niveau européen pour la plupart des organismes de quarantaine repris dans la directive 2000/29/CE.

Rappelons que l'application des directives en matière de quarantaine végétale reste une compétence nationale. Les Organisations Nationales de Protection des Végétaux (ONPVs - NPPOs) doivent donc trouver un équilibre entre la protection de leur agriculture nationale et le libre-échange prôné par l'Organisation Mondiale du Commerce (OMC) et l'Union douanière européenne. Cet équilibre doit respecter les mesures sanitaires et phytosanitaires de l'OMC (accord SPS - Sanitary and Phytosanitary Measures) qui exigent que les restrictions sur les importations à des fins de quarantaine doivent reposer sur une analyse scientifique (ARP) transparente. Pour la filière d'importation étudiée, cette analyse a donc pour but, d'une part, l'évaluation du risque phytosanitaire qui consiste à déterminer, par l'accumulation de preuves scientifiques, la probabilité d'entrée et d'établissement d'un nouveau pathogène dommageable pour l'agriculture et l'environnement d'une zone territoriale donnée et, d'autre part, la gestion du risque phytosanitaire, qui consiste à prévoir les mesures concrètes qui peuvent être entreprises afin d'éviter l'entrée et l'établissement du pathogène au regard des conséquences économiques et environnementales encourues.

C'est dans ce contexte, pour le moins difficile, que différentes initiatives européennes ont récemment vu le jour afin d'harmoniser la politique de l'Union autour du thème unificateur de l'ARP européenne. La commission Européenne et l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA European Food Safety Authority), en étroite collaboration avec différentes ONPVs et l'Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes (OEPP - EPPO), ont été les moteurs de ces actions qui ont débouché sur le subventionnement de différents projets de recherche.

Etant donné le rôle central des ARPs dans l'harmonisation de la politique de quarantaine végétale de l'Union, la Commission européenne et l'EFSA ont décidé de financer chacune un projet de recherche ayant trait à cette thématique. Il s'agit, d'une part, du projet PRATIQUE qui s'inscrit dans le 7^e Programme-cadre pour la recherche et le développement technologique (FP7) et, d'autre part, du projet Prima phacie financé par l'EFSA. Le projet PRATIQUE vise à améliorer les procédures de l'ARP (schéma OEPP principalement) afin de les rendre plus fiables

et plus pratiques pour les utilisateurs finaux. Cette amélioration passe, entre autres, par la mise en place d'un inventaire structuré des données nécessaires aux ARPs pour l'UE et par la meilleure intégration de la notion d'incertitude dans le résultat final des ARPs. Le projet Prima phacie, quant à lui, teste plusieurs méthodologies d'ARP sur des organismes nuisibles repris dans les différents règnes biologiques afin d'en éprouver la robustesse. L'objectif poursuivi est de sélectionner une ou plusieurs méthodologies dont l'EFSA pourra se servir à l'avenir pour endosser, avec la collaboration de groupes d'experts et de l'OEPP, son rôle d'évaluateur du risque phytosanitaire pour l'UE.

Pour initier et alimenter ces ARPs avec des données scientifiques, la Commission européenne a souhaité, par le financement du projet de recherche Euphresco II (qui fait suite à un premier projet du même nom), l'établissement d'une structure autoportante de mise en réseau des différentes institutions de recherche et bailleurs de fonds européens, ceci afin de fédérer l'expertise et le financement des différents Etats, d'éviter les problèmes de doublons et d'incohérences et d'identifier les nouvelles problématiques. Cette structure, à laquelle participe le LNR belge (CRA-W et ILVO) exercera donc un rôle de lobby auprès de la Commission afin d'orienter sa politique de subventionnement et ses choix d'ARPs vers les thématiques identifiées par le réseau d'experts d'Euphresco. Enfin, le projet Q-Bol, également financé par la Commission à travers le FP7 et qui vise le développement de code-barres génétiques pour l'identification précise et rapide des organismes de quarantaine et donc l'amélioration de la surveillance du territoire de l'UE, vient compléter l'ensemble.

En conclusion, même si le rôle exact des différents intervenants cités plus haut reste à définir, on assiste à l'affirmation de deux réseaux fortement interconnectés (voir figure1).

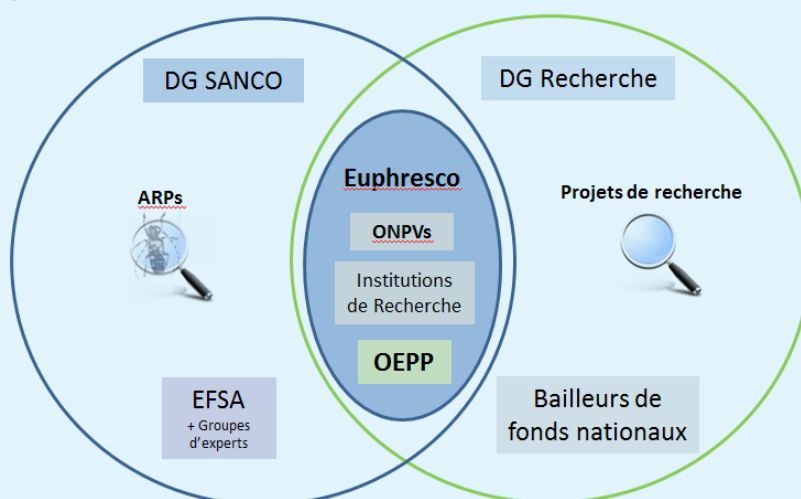
Tout d'abord, le réseau ARP constitué d'une part, de la Direction générale de la santé et des consommateurs (DG SANCO), en collaboration avec les ONPVs, comme gestionnaire du risque phytosanitaire pour l'UE et, d'autre part, de l'EFSA épaulée par l'OEPP et ses groupes d'experts pour l'évaluation de ce risque.

Le second réseau, que l'on pourrait qualifier de réseau 'recherche quarantaine végétale', est quant à lui constitué, d'une part, de la structure Euphresco en collaboration avec l'OEPP et, d'autre part, des bailleurs de fonds nationaux et de la Direction Générale de la Recherche et de l'Innovation (DG Recherche). Ce dernier réseau initiera et alimentera les ARPs européennes prises en charge par le premier.

A travers les projets évoqués dans le présent article, c'est donc l'ébauche du futur réseau européen de la recherche en Phytopathologie de quarantaine qui se dessine.

Figure 1 :
Schéma des deux réseaux
interconnectés ARPs
et Recherche en quarantaine végétale

t.olivier@cra.wallonie.be



Nouvelles du Laboratoire européen de Référence pour le Lait et les Produits laitiers (EU-RL MMP), Paris, 2011

Véronique Ninane* & Koen De Reu**

*CRA-W, Département Valorisation des Productions, 24 Chaussée de Namur, B-5030 Gembloux

**ILVO-T&V, Instituut voor Landbouw en Visserijonderzoek – Eenheid Technologie en Voeding, Brusselsesteenweg 370, B-9090 Melle

Introduction

L'EU-RL MMP organise annuellement une session de travail à l'attention des laboratoires nationaux de référence (LNR). La dernière en date, qui a eu lieu à Paris les 2 et 3 mai 2011, concernait l'ensemble du domaine analytique incombant à l'EU-RL MMP. Les avancées ainsi que les besoins, analytiques et législatifs, relatifs à la flore totale, aux cellules somatiques et à la phosphatase alcaline y ont été présentés et débattus.

Prestations des Laboratoires européens de Référence (EU-RLs)

Klaus Kostenzer, le représentant de la DG-SANCO de la Commission européenne, a introduit la session de travail en exposant les tenants et aboutissants de la récente évaluation des activités menées par les différents EU-RLs. La qualité des prestations effectuées par l'EU-RL MMP a, à cette occasion, été jugée bonne, voire très bonne.

Conduite d'essais inter-laboratoires

Le vif du sujet a été abordé par une thématique commune à tous les paramètres analytiques : la conduite d'essais comparatifs inter-laboratoires.

Soraya Amarouche, du Laboratoire national de métrologie et d'essai (LNE) français, a situé le contexte normatif du thème et expliqué brièvement les normes ISO 17043 (2010) : Exigences générales concernant les essais d'aptitude, et ISO 13528 (2005) : Méthodes statistiques utilisées dans les essais d'aptitude par comparaisons inter-laboratoires. Cette dernière complète le Guide 43 de l'ISO en fournissant une description détaillée de méthodes statistiques à utiliser par les organisateurs d'essais d'aptitude et en donnant des recommandations sur leur utilisation. Elle fournit entre autres une valeur seuil indicative permettant de juger de l'homogénéité des échantillons; Soraya Amarouche a toutefois insisté sur le fait que celle-ci n'est pas toujours appropriée et peut dès lors être adaptée. L'organisation pratique d'essais inter-laboratoires a été illustrée par les représentants de deux LNRs, Karin Knappstein (MRI, Kiel, Germany) pour le LNR allemand et Koen De Reu (ILVO-T&V, Melle, Belgique) pour le LNR belge, ainsi que par Thomas Berger d'Agroscope (Liebefeld-Posieux, Suisse). La finalité des essais inter-laboratoires était différente pour chacun des intervenants : comparaison des appareils de routine entre eux, comparaison des appareils de routine entre eux et avec la méthode de référence, ou détermination de la valeur d'un matériau de référence, respectivement. Koen De Reu a également expliqué le procédé d'évaluation des prestations du LNR

belge, par l'intermédiaire d'indicateurs de performance, et le système de pénalisation financière qui y est associé. A la lumière de ces exposés, le système belge semblait à la pointe du développement européen en matière de guidance analytique. Les représentants de tous les Etats membres étaient impressionnés par l'ensemble très complet des essais inter-laboratoires proposés et par le fait qu'ils le sont en partie sous accréditation : certains essais inter-laboratoires sont préparés sous accréditation à l'ILVO-T&V. De nombreuses questions ont ainsi été posées après l'exposé de Koen De Reu.

La conduite d'essais inter-laboratoires est régulièrement revenue au centre des préoccupations par le biais d'exposés relatifs à l'état d'avancement des études, ou projets d'étude, de stabilité conduites par l'EU-RL MMP. L'EU-RL MMP développe en effet des projets visant à identifier des protocoles de traitement et de gestion des échantillons en adéquation avec une perspective de distribution pour essais entre des laboratoires géographique-ment distants. La stabilité d'échantillons de lait cru de chèvre, avec ou sans adjonction d'agents de conservation, vis-à-vis de la flore totale a ainsi été éprouvée à 12°C pendant 10 jours (Rabed Miled, ANSES, Paris). Il ressort de cette étude que l'ajout d'un mélange d'acide borique, de glycérol et de sorbate de potassium confère au lait cru de chèvre une stabilité optimale vis-à-vis de la flore totale. Un projet futur concerne la formulation d'échantillons de lait cru de vache naturellement contaminés en cellules somatiques et stables vis-à-vis de ce paramètre (Alexandra Cauquil, ANSES, Paris). Le projet a été discuté et enrichi, notamment, de la communication faite par Koen De Reu à propos de la préparation que le LNR belge applique aux échantillons de lait cru de vache destinés aux essais inter-laboratoires portant sur le dénombrement des cellules somatiques. Enfin, le protocole de vérification de l'homogénéité et de la stabilité des échantillons de lait distribués lors de l'essai inter-laboratoire organisé par l'EU-RL MMP pour la détermination de la phosphatase alcaline a été expliqué (Caroline Vignaud, ANSES, Paris).

Flore totale

La validation des méthodes alternatives et l'établissement de leur relation de conversion restent au centre des préoccupations pour le critère flore totale.

La flore totale du lait cru peut être dénombrée à l'aide d'une méthode alternative pour autant qu'elle ait été validée par rapport à la méthode de référence en respectant les prescriptions de la norme ISO 16140. Etablies pour les denrées alimentaires, les prescriptions de la norme ISO 16140 sont peu adaptées et peu claires pour la matrice sous objet : le lait cru. Pour les expliciter, l'EU-RL MMP les a complétées à l'aide de normes spécifiques au lait, les normes FIL/IDF 161 en révision (ISO 16297 et 128), et préparé une synthèse pratique des références à consulter pour exécuter chacun des points de validation mentionnés dans la normes ISO 16140 (Véronique Deperrois, ANSES, Paris).

Concernant la relation de conversion des méthodes alternatives, la flore totale du lait cru est déterminée à l'aide de méthodes instrumentales dotées de relations de conversion propres à chacun des pays. A l'issue de la réunion précédente, il avait été proposé de constituer un groupe de travail pour évaluer la faisabilité d'harmoniser les relations de conversion au sein de l'EU (Ninane & Werbrouck, 2010). L'EU-RL MMP a démarré l'étude de faisabilité en identifiant trois approches statistiques envisageables pour déterminer l'incidence du facteur régional (l'origine géographique) sur la relation de conversion (Laurent Guillier, ANSES, Paris). Les membres qui s'étaient engagés à participer au groupe de travail, dont Véronique Ninane (CRA-W) pour le LNR belge, seront invités à contribuer à la suite de l'étude.

Enfin, l'EU-RL MMP a entrepris une étude visant à identifier les facteurs influençant la relation de conversion du Bactocount (Bentley, USA) pour le dénombrement de la flore totale de lait cru de chèvre (Rabed Miled, ANSES, Paris).



Cellules somatiques

Les discussions relatives au comptage des cellules somatiques portaient essentiellement sur l'aptitude des laboratoires de référence à appliquer la méthode microscopique décrite dans la norme ISO 13366-1 qui est la méthode de référence pour ce paramètre. Pour évaluer la capacité du réseau analytique européen à appliquer cette méthode, l'EU-RL MMP a organisé un essai inter-laboratoire à la fin de l'année 2010 (Alexandra Cauquil, ANSES, Paris). Il ressort de cet essai que 85% des laboratoires participants, dont le LNR belge, appliquent la méthode de façon satisfaisante. L'identification des difficultés rencontrées par les laboratoires déficients, réalisée avec l'aide de l'EU-RL MMP, devrait améliorer ce score. Les résultats de cet essai montrent aussi que les performances globales du réseau européen, en termes de répétabilité et de reproductibilité, se sont améliorées par rapport à l'essai antérieur (2008). L'EU-RL MMP envisage d'envisager encore les améliorer en organisant une session d'entraînement pratique.

Parallèlement, la mise en place d'une structure visant à produire un matériau de référence pour le comptage des cellules somatiques devrait aider à améliorer à la fois les performances de la méthode de référence et la cohésion des méthodes de routine. La Fédération Internationale de Laiterie (FIL) et, conjointement, l'International Committee for Animal Recording (ICAR, Italie) travaillent à la mise en place d'une telle structure organisationnelle dite système de référence (Thomas Berger, Agroscope, Liebefeld-Posieux, Suisse). Le LNR belge est associé à l'élaboration de ce système de référence par l'intermédiaire de Véronique Ninane (CRA-W, Gembloux, Belgique) qui participe activement à ce groupe de travail de la FIL et d'ICAR.

Phosphatase alcaline

Concernant la phosphatase alcaline, dont l'activité est utilisée comme traceur de la pasteurisation, plusieurs aspects analytiques ont été examinés.

L'un d'eux concerne la validation de la méthode fluorométrique décrite dans la norme ISO 11816-1 (2006) pour une application au lait de chèvre. L'EU-RL MMP a organisé un essai inter-laboratoires en 2010 pour déterminer la répétabilité et la reproductibilité de la méthode dans du lait de chèvre. Cet essai impliquait 22 laboratoires, dont l'ILVO-T&V pour le LNR belge, et portait sur 6 niveaux d'activité de la phosphatase alcaline (Anne-Cécile Boitelle, ANSES, Paris) La qualité des résultats de cet essai inter-laboratoire autorise leur utilisation à des fins de validation telle qu'était ambitionnée sa finalité.



Figure 1: L'instrument de mesure Fluorophos, et son bloc d'incubation, pour déterminer l'activité de la phosphatase alcaline

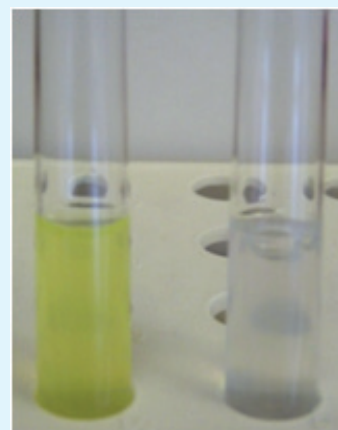


Figure 2: Echantillons positif (gauche) et négatif (droite) vis-à-vis de la teneur en phosphatase alcaline



Un autre aspect débattu au cours de cette session concerne l'activité résiduelle de la phosphatase alcaline dans du lait de chèvre pasteurisé et, plus précisément, la limite d'activité légalement acceptable. Concrètement, l'EU-RL MMP a analysé la possibilité d'appliquer au lait de chèvre la limite de 350 mU/l fixée par l'EU pour le lait de vache. Il ressort de son analyse que l'activité de la phosphatase alcaline après pasteurisation du lait de chèvre est en général inférieure à la limite fixée pour le lait de vache mais elle dépasse cette limite dans les laits de chèvre provenant de deux Etats membres (Marina Nicolas, ANSES, Paris). L'option législative revient à la DG SANCO qui est maintenant en possession de suffisamment de données pour pouvoir statuer.

L'établissement d'une limite d'activité pour les fromages préparés à partir de lait pasteurisé figurait également au programme des sujets à développer au cours de cette session de travail. L'adoption d'une limite repose sur le recensement des valeurs rencontrées dans la pratique et dès lors sur la capacité des laboratoires à déterminer l'activité de la phosphatase alcaline dans les fromages. Dans l'optique de promouvoir l'aptitude analytique du réseau de LNRs, l'EU-RL MMP avait organisé en 2009 une session pratique relative à l'application de la norme ISO 11816-2 (à l'époque en révision) qui décrit la méthode de référence pour ce paramètre. Suite à cela, la capacité des LNRs à appliquer la méthode a été évaluée par un essai inter-laboratoire. Quatre des 19 laboratoires participants ne présentaient pas une capacité analytique satisfaisante et furent à nouveau briefés puis engagés dans un test d'évaluation. Au terme de ces deux sessions d'apprentissage et d'évaluation, 17 laboratoires, dont l'ILVO-T&V pour le LNR belge, ont été jugés aptes à déterminer correctement l'activité de la phosphatase alcaline dans le fromage. Le recensement des valeurs d'activité résiduelle de la phosphatase alcaline rencontrées dans la pratique peut à présent être complété de façon à représenter au mieux la réalité fromagère européenne (Marina Nicolas, ANSES, Paris).

Entre-temps, l'EU-RL MMP a proposé de prendre une limite de travail de 10 mU/g, à réajuster si nécessaire. Son applicabilité a d'ores et déjà été éprouvée sur quelques fromages.

Le laboratoire Agroscope (Suisse) a ainsi éprouvé cette limite sur une gamme de fromages suisses au lait de vache en appliquant strictement la méthode de référence (Charlotte Egger, Agroscope, Liebefeld-Posieux, Suisse). Tous les fromages au lait cru ou thermisé qui ont été analysés présentaient une activité supérieure à 10 mU/g tandis que la plupart des fromages au lait pasteurisé avait une activité résiduelle de la phosphatase alcaline inférieure à 10 mU/g. C'est un fromage à pâte molle, le Limburger, qui présentait une activité résiduelle de la phosphatase alcaline supérieure à 10 mU/g alors qu'il avait été préparé à partir de lait pasteurisé. Dans ce cas, la flore de surface du fromage avait contribué à l'activité mesurée de la phosphatase alcaline : mesurée après éviction d'une plus grande épaisseur de croûte que prévue par la norme pour ce type de fromage (0,5 cm au lieu de "la plus mince possible") l'activité de la phosphatase alcaline était bel et bien inférieure à 10 mU/g. L'importance de la position de l'échantillon au sein du fromage a par ailleurs été illustrée par le cas des grandes (80-100 cm de diamètre) roues de fromage au lait thermisé : les roues sont tellement grandes que le centre du fromage reste chaud suffisamment longtemps pour que la phosphatase alcaline soit désactivée à la façon d'une pasteurisation.

Si, pour les fromages suisses, un accommodement de la norme semble en première approche suffire à l'acceptabilité de la limite proposée, il n'en va pas de même pour d'autres types de fromage. L'EU-RL MMP a en effet montré que le procédé de fabrication de certains fromages peut être à l'origine d'une modification de l'activité de la phosphatase alcaline et conduire à une interprétation erronée du résultat (Marina Nicolas, ANSES, Paris). Ainsi le procédé de fabrication de fromages de type Mozzarella inactive dans certains cas la phosphatase alcaline et conduit à une activité inférieure à 10 mU/g alors que le fromage a été préparé avec du lait cru. Le cas inverse, c'est-à-dire un fromage préparé à partir de lait pasteurisé qui présente une activité de la phosphatase alcaline supérieure à 10 mU/g a également, et à nouveau, été soulevé. Dans ce cas, une activité supérieure à 10 mU/g a été mesurée jusqu'au cœur du fromage et pas uniquement en surface comme ce l'était pour le Limburger ; l'éviction d'une croûte plus épaisse ne permet dès lors pas de contourner le problème. Selon toute vraisemblance la flore microbienne serait, ici aussi, à l'origine de cette activité anormalement élevée de la phosphatase alcaline. Au niveau analytique, la méthode ISO 11816-2 de détermination de la phosphatase alcaline dans le fromage doit

encore être validée. Dans cette optique, l'EU-RL MMP prévoit de mener l'étude préliminaire de caractérisation de la méthode en 2011 et le volet inter-laboratoire de la validation en 2012.

Enfin, pour contrôler la pasteurisation de laits provenant d'autres espèces animales comme le lait de chamelle, par exemple, d'autres marqueurs que la phosphatase alcaline, tels la lactoperoxidase ou le γ -GT, sont envisagés.

Référence

Ninane V. & Werbrouck H. (2010). Session de travail des LNRs Laits et produits laitiers, Paris, 2010. Labinfo AFSCA, 5, 25-27.

ninane@cra.wallonie.be

koen.dereu@ilvo.vlaanderen.be



Workshops & Symposia

| Date | Sujet | Lieu | Plus d'infos (site web) |
|-----------------|--|--|--|
| 26.01.2012 | Workshop Nieuwe EU-wetgeving: Wat verandert er op het etiket? | De Biltse Hoek, de Bilt, the Netherlands | http://www.fooddoctors.com/Workshops/Programma.pdf |
| 31.01-1.02.2012 | Second International Symposium on Hyphenated Techniques for Sample Preparation (HTSP-2) | Bruges, Belgium | http://www.ordibo.be/htc/ |
| 1-3.02.2012 | Twelfth International Symposium on Hyphenated Techniques in Chromatography and Hyphenated Chromatographic Analyzers (HTC-12) | Bruges, Belgium | http://www.ordibo.be/htc/ |
| 13-14.02.2012 | 3rd International Fresenius FEED Conference Efficacy – Claims – Mode of Action | Cologne, Germany | http://www.akademie-fresenius.com/english/konferenz/output.php?kurs=306 |
| 28-29.02.2012 | 10th International Fresenius Conference "Food Safety and Dietary Risk Assessment" | Mainz, Germany | http://www.akademie-fresenius.com/2030 This conference will provide you with an up-to-date overview on the subject of assessing the risks of pesticide residues in food. |
| 11-15.03.2012 | Pittcon 2012 | Orlando, FL, USA | Pittcon is the world's largest annual conference and exposition for laboratory science. |
| 20-23.03.2012 | IDF Regional Conference on Domestic Milk Supply and Demand Systems : Sharing Success Beyond Challenges! | Seoul, Korea | http://www.2012idfrc.or.kr/ |
| 20-21.03.2012 | International Fresenius Conference The New Food Information Regulation | Cologne, Germany | http://www.akademie-fresenius.com/english/konferenz/output.php?kurs=312 For professionals working in food manufacturing and in the food trade industry as well as in food law and in the regulatory affairs field. |
| Spring of 2012 | 4th International Fresenius Conference "Health Claims" | Germany | European and international specialists, with backgrounds in the industry, the legal field and the monitoring authorities, will discuss all the latest Health Claims developments. For more information: Telephone +49 231 75896-54 or astaudenmaier@akademie-fresenius.de . |
| 19/04/2012 | AOAC-LL Symposium: "Food Allergens" | Breda, the Netherlands | www.aoaclowlands.nl |

| | | | |
|----------------|---|--------------------------|---|
| 20-24.05.2012 | IDF International Symposium on Cheese Ripening and Technology | Madison, Wisconsin, USA | http://www.idfcheeseus2012.com/ |
| 21-25.05.2012 | QBOL EPPO Conference on DNA Barcoding and diagnostic methods for plant pests | Haarlem, the Netherlands | www.eppo.org |
| 22.05.2012 | 64th International Symposium on Crop Protection | Gent, Belgium | http://www.iscp.ugent.be/ |
| June 2012 | 2nd Global conference on GMO analysis | Como, Italy | http://mbg.jrc.ec.europa.eu/home/ |
| 4-8.06.2012 | 2012 IDF/ISO Analytical Week | Tel Aviv, Israel | http://www.idf-iso-analytical-week.org |
| 19-21.06.2012 | IDF/INRA International Symposium on Spray Dried Dairy Products | St. Malo, France | http://www.fil-idf.org/Public/SiteEventType.php?ID=23123 http://www.colloque.inra.fr/sddp2012 |
| 25-26.06.2012 | 14th International Fresenius AGRO Conference Behaviour of Pesticides in Air, Soil and Water | Mainz, Germany | http://www.akademie-fresenius.com/english/konferenz/output.php?thema=3&kurs=295 |
| 25-28.06.2012 | 9th European Pesticide Residue Workshop (EPRW 2012) | Vienna, Austria | http://www.ages.at/ages/eprw2012/ The European Pesticide Residue Workshop (EPRW) is the premier European meeting for the presentation and discussion of the latest concepts and developments in the field of pesticide residues in food and drink. |
| Summer of 2012 | 5th International Fresenius Conference "Food Allergens" | Mainz, Germany | http://www.akademie-fresenius.com/english/konferenz/output.php?thema=3&kurs=294 |
| Summer of 2012 | 2nd International Fresenius Conference "Residues of Food Contact Materials in Food" | Germany | This conference is primarily aimed at food and packaging producers concerned with the safety and quality of food and packaging materials. For more information: Telephone +49 231 75896-82 or smummenbrauer@akademie-fresenius.de . |
| 1-4.07.2012 | Second International Woody Ornamental Symposium | Gent, Belgium | http://www.ilvo.vlaanderen.be/woodyornamentals2012 |
| 12-17.08.2012 | 58th ICoMST International Congress of Meat Science and Technology | Montréal, Canada | http://www.biocircle-project.eu/media/6894/icomst_2012_brochure_belgique.pdf |
| 26-31.08.2012 | 32nd International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (POP's) - DIOXIN 2012 | Cairns, Australia | http://www.dioxin2012.org/ |
| 11-13.09.2012 | Fourth international conference on Feed Safety – Methods and Challenges | Beijing, P.R. China | http://www.feedsafety.org/ |



| | | | |
|-----------------|---|---|---|
| 20-21.09.2012 | 17th Conference on Food Microbiology | Brussels, Belgium | www.bsfm.be |
| 30.09-3.10.2012 | 126th AOAC Annual Meeting & Exposition | Las Vegas, USA | http://www.aoac.org |
| 3-9.11.2012 | IDF World Dairy Summit | Cape Town, South Africa | http://www.fil-idf.org/Public/SiteEventType.php?ID=23123 |
| 5-9.11.2012 | 7th Conference of The World Mycotoxin Forum® and XIIIth IUPAC International Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins | Rotterdam, the Netherlands | <p>http://www.wmfmeetsiupac.org/html/welcome.asp</p> <p>This unique combined event, WMF meets IUPAC, will build on the success of the previous conferences which were held separately all over the world.</p> <p>The aim of WMF meets IUPAC is to increase awareness of human and animal health risks due to natural toxicant contamination in agricultural commodities and seafood, and of potential risk management options, technologies and strategies for minimized contamination. The event will focus in particular on mycotoxins, phycotoxins and plant toxins.</p> |
| 7-10.05.2013 | EuroFoodChem XVII | Istanbul, Turkey | <p>http://www.arber.com.tr/eurofoodchemxvii.org/index.php/home</p> <p>with state-of-the-art knowledge and applications in food chemistry and complementary disciplines</p> |
| 25-29.08.2013 | 24th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) | Perth Exhibition Centre, Perth, Western Australia | http://www.waavp.org/ |
| October 2013 | IDF World Dairy Summit | Yokohama, Japan | http://www.fil-idf.org/Public/SiteEventType.php?ID=23123 |





Labinfo