

# Détection des protéines animales transformées : expérience et perspectives européennes

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

(1) Epidémiologie 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'Etude 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

## **Détection des protéines animales transformées : expérience et perspectives**

### **européennes**

#### **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 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 (PCR, immunologie), de microscopie ou d'imagerie proche infra rouge 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 :** encéphalopathie spongiforme bovine, farines animales, protéines animales transformées, éléments en traces, contaminations croisées, techniques de détection.

## 1. INTRODUCTION

Les Encéphalopathies Spongiformes Transmissibles (EST) sont des maladies dégénératives du système nerveux central (SNC). Elles se retrouvent dans de nombreuses espèces animales comme chez le bovin, où elle porte le nom d'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) (114). Chez l'homme, il y a notamment la maladie de Creutzfeld-Jakob (MCJ) et son nouveau variant (vMCJ) (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, (114). 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 (73).

La cause la plus probable de 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 ( $\text{PrP}^{\text{res}}$ ) (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, épicerie de la crise, les premiers cas cliniques confirmés d'ESB sont apparus durant les années 80 (26) suite à une modification de 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  $\text{PrP}^{\text{res}}$  (89). C'est pour cela 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<sup>er</sup> janvier 2001 (92). Les farines de poisson sont également interdites dans l'alimentation des ruminants depuis le 1<sup>er</sup> janvier 2001 (93) excepté

pour les ruminants non sevrés (102) et le cannibalisme est également prohibé depuis 2003 (96) (Tableau I).

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). 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 la réaction de polymérisation en chaîne en temps réel (PCR) ou encore des tests immunologiques peuvent être utilisés (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 ?

## **2. OBJETS, ECHANTILLONNAGE, LIEU D'ANALYSE ET**

## **EXPRESSION DES RESULTATS**

### **2.1. 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, 6 du règlement (CE) n°1774/2002 (96). En outre, la législation européenne impose le traitement thermique des PAT à 133°C, pendant 20 minutes 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<sup>er</sup> juillet 2008 comme stipulé dans le Règlement européen (CE) n°1432/2007 (98).

## **2.2. L'échantillonnage**

L'échantillonnage imposé par la législation européenne doit être représentatif du marché de l'alimentation animale d'un Etat 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 1200 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.

### **2.3. 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.

### **2.4. Définitions de critères épidémiologiques et analytiques**

Les tests inter-laboratoires permettent d'évaluer les résultats des laboratoires nationaux pour différents paramètres : exactitude, sensibilité, spécificité, vrai résultat positif, vrai résultat négatif, faux résultat positif, faux résultat négatif, 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) ou 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 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.

### **3. LA METHODE OFFICIELLE**

Le Règlement européen 152/2009/CE (101) 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 (**Figure 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 (Commission Directive 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.

A partir du 1<sup>er</sup> 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 (112). 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 la fiabilité limitée de la partie quantification du protocole (101, 106,107).

## **4. LES AUTRES METHODES DISPONIBLES**

La détection des PAT peut être également envisagée par la recherche d'ADN ou de protéines spécifiques (voire de la PrP<sup>sc</sup>). 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 de la Sp de la technique de détection des PAT dans l'alimentation du bétail en Belgique.

**4.1. 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).

## **4.2. Les méthodes de biologie moléculaire**

### **4.2.1. 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<sup>sc</sup> 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 détecter 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*") ou 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<sup>®</sup> 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 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 Feedcheck<sup>®</sup> 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 (110). Elles sont utilisées pour le contrôle du TTL, de la présence de matériel

257 issu du système nerveux central et de la détermination d'espèces dans des matières premières (21).  
258 Elles sont développées pour identifier l'espèce d'origine à partir de matières premières carnées mais  
259 beaucoup ne sont pas utilisables sur la matrice « viandes traitées à forte température » car le TTL  
260 entraîne un changement de conformation irréversible des protéines.

261 Dans les techniques ELISA sandwich, les Ac de capture sont soit polyclonaux (Acp), c'est-à-dire  
262 reconnaissant différents épitopes d'un Ag donné. Les Ac peuvent également être dits monoclonaux  
263 (Acm), c'est-à-dire reconnaissant un seul type d'épitope d'un Ag donné (22). La cible (Ag) peut être  
264 une protéine musculaire (22) comme la troponine I (TnI), protéine myofibrillaire régulatrice montrant  
265 un grand potentiel en tant que marqueur protéique thermostable pour l'identification d'espèces dans  
266 plusieurs sortes de viandes traitées thermiquement (19, 21). La principale fonction de cette troponine  
267 dans l'organisme est l'inhibition de l'ATPase actomyosine. Ses épitopes peuvent être reconnus par  
268 différents Acm, même après un traitement thermique moins drastique que celui décrit dans la  
269 législation européenne (ici, 132°C/2bars, pendant 2 heures) (21). Les Acm anti-TnI ont été mis au  
270 point (**Tableau V**) et appartiennent à la classe des immunoglobulines G (IgG).

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

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

277 Certaines protéines originelles isolées du muscle lisse, les h-caldesmon sont prometteuses pour  
278 développer un test analytique pour la détection de FVO dans l'alimentation animale. Parmi tous les  
279 Acm testés, le 5E12 a été identifié comme le meilleur candidat car il est capable de différencier les  
280 FVO de la majeure partie des ingrédients utilisés dans la production commerciale d'aliments pour  
281 animaux et de s'associer fortement sur les muscles bovins traités thermiquement. Le seuil de détection  
282 pour cet Acm est prétendu être de l'ordre de 0,05% de FVO dans l'alimentation animale (48).

283 Des Acm spécifiques du muscle porcin ont également été développés avec succès pour la détection de  
284 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 TnI traitée ou non par un TTL, c'est-à-dire de la TnI présente autant dans les matières premières que dans les muscles ayant subi un TTL (21). A 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 (48).

#### 4.2.2. La technique PCR

L'amplification en chaîne par polymérase ou plus communément notée PCR pour *Polymerase Chain Reaction* est une technique de répllication 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 répllication 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 (11, 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.

#### **4.3. Les méthodes spectroscopiques**

Il existe d'autres techniques comme les méthodes spectroscopiques permettant d'analyser des échantillons en fonction du spectre que l'ensemble des molécules constitutives donnent. Elles sont non invasives et non destructrices. Les spectres ainsi obtenus contiennent des informations sur les substrats

339 étudiés. Cependant, l'obtention de ces informations n'est pas immédiate car un traitement  
340 mathématique des données brutes est souvent nécessaire. La chimiométrie, qui est l'ensemble des  
341 méthodes statistiques et graphiques, permet d'améliorer la compréhension d'informations obtenues  
342 dans le domaine de la chimie. Elle s'applique à toutes les étapes de l'analyse, depuis la première  
343 conception de l'expérience jusqu'à l'interprétation des données.

#### 345 4.3.1. Camera proche infrarouge

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

352  
353 Un résumé comparatif des différentes techniques de détection des PAT est repris dans le **Tableau VI**.  
354 Il inclut des résultats issus d'études interlaboratoires.

## 356 5. DISCUSSION

357 Une méthode idéale de détection doit être non destructive, permettant ainsi la contre-analyse et  
358 l'analyse par d'autres méthodes de ce même sous-échantillon. L'échantillon doit être de faible poids  
359 (au moins 5g) mais doit également être représentatif du produit à analyser (97). L'hétérogénéité du  
360 produit à analyser rend nécessaire un prélèvement aléatoire de différentes portions du produit afin de  
361 constituer un pré échantillon représentatif duquel est extrait le réel échantillon servant à l'analyse.  
362 Améliorer la préparation de l'échantillon et/ou l'extraction d'une plus grande quantité de matériel peut  
363 être une solution permettant une meilleure analyse mais cela ne permet pas la conservation des  
364 échantillons à long terme (40). Les échantillons sont issus de deux types d'aliments : les matières

365 premières et les aliments composés qui sont tous les deux sujets aux contaminations croisées. Les  
366 aliments composés peuvent en outre contenir légalement des FVO (**Tableau I**).

367  
368 La détection de traces de FVO est une première étape. Vient ensuite l'étape 2 qui permet de  
369 déterminer si le TTL a bien été respecté. La troisième étape correspond à la détermination de  
370 l'espèce(s) ce qui permet de valider si l'échantillon est conforme ou non selon la législation en vigueur  
371 quant à la présence de PAT.

372 L'étape 1 est la clé de voute du diagnostic des FVO. Le test utilisé doit pouvoir détecter tout VP (avoir  
373 une Se proche de 100% et minimiser les FN) afin d'éviter les risques de contamination de la chaîne de  
374 production d'aliments pour bétail. La performance globale de détection qualitative pour la MO est  
375 jugée excellente pour 68% des 25 LNR évalués dans le cadre d'une étude menée par le EURL-AP. Les  
376 résultats de cette étude mettent également en évidence l'importance de réaliser un dépistage sur base  
377 de l'observation d'un nombre minimum de particules avant de conclure quant à la présence ou  
378 l'absence de constituants animaux dans l'alimentation du bétail (107). Les résultats obtenus à partir  
379 des tigettes chromatographiques sont pour l'instant décevants. Les fenêtres de lecture ne sont pas  
380 fiables et trop étroites, l'enregistrement numérique de la preuve est impossible, elles doivent être  
381 utilisées par un analyste expérimenté, et les FN varient en fonction de l'analyte utilisé. Leur faible Sp  
382 (66%) ainsi que l'existence de FP sont autant de points négatifs à mettre en avant. Par ailleurs, bien  
383 qu'un traitement thermique de la matrice (125 à 131°C pendant 5 minutes, sur une durée totale de 30  
384 minutes) améliore les performances du test, ce barème n'est pas conforme par rapport aux exigences  
385 européennes (69).

386 Pour augmenter la Se du test de détection des techniques immunologiques, une double précipitation  
387 précédée d'une étape de préchauffage avant l'étape de détection peuvent être réalisées afin de minorer  
388 les FN qui sont élevés en présence de graisse ou d'huile. Une recherche est alors ciblée sur la fraction  
389 de protéine thermostable grâce à l'utilisation d'Ac thermorésistants (3, 4). Toutefois, dans les  
390 techniques immunologiques, le traitement thermique appliqué est insuffisant pour répondre aux  
391 exigences européennes en la matière (21, 22). La Se peut également être améliorée par l'emploi d'un  
392 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 faible concentration 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 (10, 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



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

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

439 Une technique idéale doit également avoir une LOD la plus faible possible. Cette LOD est utile pour la  
440 méthode servant de premier filtre quant à l'analyse des échantillons. La MO est actuellement utilisée  
441 comme technique de référence et possède une LOD estimée inférieure à 0,1% de fragments d'os. Ce  
442 seuil doit au moins être atteint par toute autre technique revendiquant la dénomination de méthode  
443 officielle. Celle-ci combinée à l'analyse NIR, tout comme la MO, peut détecter jusqu'à 0,05% de FVO  
444 dans l'alimentation animale (7). La LOD des techniques immunologiques de type ELISA sandwich  
445 avoisine les 0,5% de FVO. Elles permettent une détection directe des protéines, et ne nécessitent pas la  
446 présence de fragments d'os. En plus, leur utilisation est possible sur les échantillons liquides. La LOD  
447 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 se trouvant 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 induites par le 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 faibles coûts; 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'automation. 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, prémélanges). 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 (109). La méthode ELISA est une méthode fiable pour la surveillance du TTL (96, 109).

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

510 Enfin lors de l'étape 3, une technique idéale doit être capable de confirmer l'espèce d'origine et le  
511 tissu de provenance afin de vérifier la légalité de cette présence. Les techniques immunologiques de  
512 type ELISA sandwich identifient les Ag de protéines animales spécifiques d'espèces. En ce qui  
513 concerne la PCR, les sondes habituellement choisies pour ce type d'échantillon (souvent fortement  
514 dégradé) sont des sondes présentes en grand nombre dans le génome telles que l'ADN mitochondrial,  
515 les séquences répétitives dans le génome telles que les « mammalian-wide interspersed » (MIRs) de  
516 l'ADN satellite (16) ou des courts ou longs éléments nucléotidiques intercalés (SINEs et LINEs) (60,  
517 83). Le choix d'une sonde sélectionnée sur deux gènes (tARN<sup>lys</sup>/ATP8) où la succession est typique  
518 de l'espèce animale (84) et d'une sonde correspondant à une région qui est présente en plusieurs  
519 copies dans les cellules (ADN mitochondrial) a prouvé son intérêt. Des combinaisons de différentes  
520 sondes (primers) ont été définies et testées sur des matrices bovine et porcine mais des combinaisons  
521 d'autres espèces (poulet, mouton et poisson) sont encore en développement (38).

522 Bien que les méthodes basées sur la PCR soient assez spécifiques et sensibles pour déterminer la  
523 nature de l'échantillon, elles ne sont en général pas capables de faire la distinction entre différents  
524 tissus de la même espèce (21) à la différence des tests immunologiques. Les résultats peuvent varier en  
525 fonction d'un grand nombre de paramètres, tels que l'origine du muscle et sa part dans une farine  
526 animale, les pourcentages de graisses, la maturité de la viande et les procédés technologiques  
527 employés. Ainsi, les techniques d'identification des espèces animales, quelles qu'elles soient (analyses  
528 de protéines, analyse de l'ADN), ne fournissent très généralement que des résultats semi-quantitatifs  
529 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 24h. 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 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 événementiel 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.

## **6. 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 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 tigette 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 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, renforcer la législation et le 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 (115). Des doses très faibles de prions pathogènes (1mg au lieu d'1g) 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.

612 Avoir un outil de détection hautement fiable pour la détermination de l'espèce d'origine des farines  
613 animales permettrait d'assouplir la législation et de valoriser au mieux des matières alimentaires.  
614



## 7. 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) no 357/2008 de la Commission du 22 avril 2008 modifiant le règlement (CE) no 999/2001 du Parlement européen et du Conseil fixant les règles pour la prévention, le contrôle et l'éradication de certaines encéphalopathies spongiformes transmissibles - Adresse URL : [http://www.afsca.be/sp/sous-prod/doc07/2008-04-25\\_circulaire-MRS\\_FR.pdf](http://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. (2000a). - 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. (2000b). - 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. (2004a). - 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. (2004b). - 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., Garrido A., Vancutsem J., Michotte Renier A. & Dardenne P. (2005a). - Detection of banned meat and bone meal in feedstuffs by near-infrared microscopic analysis of the dense sediment fraction. *Anal Bioanal. Chem* , **382**, 149-157.
8. Baeten V., von Holst C., Fissiaux I., Michotte Renier A., Murray I. & Dardenne P. (2005b). - 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 for Official Publications of the European Communities), Luxembourg, 71-97

645 [http://bookshop.europa.eu/eubookshop/FileCache/PUBPDF/KINA21124ENC/KINA21124ENC\\_002.](http://bookshop.europa.eu/eubookshop/FileCache/PUBPDF/KINA21124ENC/KINA21124ENC_002.pdf)  
646 pdf)

647 9. Bellagamba F., Moretti V. M., Commencini S. & Valfre F. (2001). - Identification of species in  
648 animal feedstuffs by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of  
649 mitochondrial DNA. *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 3775-3781.

650 10. Bellagamba F., Valfre F., Panseri S. & Moretti V. (2003). - Polymerase chain reaction-based  
651 analysis to detect terrestrial animal protein in fish meal. *J. Food Prot.*, **66**, 513-518.

652 11. Bellagamba F., Commencini S., Ferretti L., Valfre F. & Moretti V. (2006). - Application of  
653 quantitative real-time PCR in the detection of prion-protein gene species-specific DNA in animal meals  
654 and feedstuffs. *J. Food Prot.*, **69**, 891-896.

655 12. Bjorklund E., Pallaroni L., Von Holst C. & Unglaub W. (2001). - Method of determination of  
656 appropriate heat treatment of animal meal by immunoassay developed for detection of cooked beef :  
657 interlaboratory study. *J. AOAC Int.*, **84** (6), 1839-1845.

658 13. Bottero M., Dalmaso I., Nucera D., Turi R., Rosati S., Squadrone S., Gorla M. & Civera T.  
659 (2003). - Development of a PCR assay for the detection of animal tissues in ruminant feeds. *J. Food*  
660 *Prot.*, **66**, 2307-2312.

661 14. Brodmann P. D. & Moor D. (2003). - Sensitive and semi-quantitative TaqMan<sup>TM</sup> real-time  
662 polymerase chain reaction systems for the detection of beef (*Bos Taurus*) and the detection of the  
663 family *Mammalia* in food and feed. *Meat Sci.*, **65**, 599-607.

664 15. Bruce M., Will R., Ironside J., McConnell I., Drummond D., Suttie A., McCardle L., Chree A.,  
665 Hope J., Birkett C., Cousens S., Fraser H. & Bostock C. (1997). - Transmissions to mice indicate that  
666 "new variant" CJD is caused by the BSE agent. *Nature*, **389**, 498-501.

667 16. Calvo J., Rodellar C., Zaragoza P. & Osta R. (2002). - Beef- and bovine-derived material  
668 identification in processed and unprocessed food and feed by PCR amplification. *J. Agric. Food.*  
669 *Chem.*, **50**, 5262-5264.

670 17. Campagnoli A., Pinotti L., Tognon G., Cheli F., Baldi A. & Dell'Orto V. (2004). - Potential  
671 application of electronic nose in processed animal proteins (PAP) detection in feedstuffs. *Biotechnol.*  
672 *Agron. Soc. Environ.*, **8** (4), 253-255.

673 18. Chen F. & Hsieh Y.-H. (2000). - A monoclonal antibody-based ELISA for detection of pork in  
674 heat processed meat products. *J AOAC Int.*, **83**, 79-85.

- 675 19. Chen F. & Hsieh Y.-H. (2001). - Separation and characterization of a porcine-specific  
676 thermostable muscle protein from cooked pork. *J. Food Sci*, **66**, 799-803.
- 677 20. Chen F., Hsieh Y.-H. & Bridgman C. (1998). - Monoclonal antibodies to porcine thermal-stable  
678 muscle protein for detection of pork in raw and cooked meats. *J. Food Sci*, **63**, 201-205.
- 679 21. Chen F., Hsieh Y.-H. & Bridgman C. (2002). - Monoclonal antibodies against troponin I for the  
680 detection of rendered muscle tissues in animal feedstuffs. *Meat Sci.*, **62**, 405-412.
- 681 22. Chen F., Hsieh Y.-H. & Bridgman C. (2004). - Monoclonal antibody-based sandwich enzyme-  
682 linked immunosorbent assay for sensitive detection of prohibited ruminant proteins in feedstuffs. *J.*  
683 *Food Prot.*, **67**, 544-549.
- 684 23. Colgan S., O'Brien L., Maher M., Shilton N., McDonnell K. & Ward S. (2001). - Development of  
685 a DNA-based assay for species identification in meat and bone meal. *Food Res. Int.*, **34** (5), 409-414.
- 686 24. Colombo F., Marchisio E., Trezzi I., Peri V., Pinotti L., Baldi A. & Soncini G. (2004). - A  
687 preliminary trial using multi-target polymerase chain reaction (multiplex PCR) and restriction  
688 fragment length polymorphism (PCR-RFLP) on the same feedstuffs to detect tissues of animal origin.  
689 *Vet. Res. Commun.*, **28**, 461-466.
- 690 25. Collinge J. & Rossor M. (1996). - A new variant of prion disease. *Lancet*, **347**, 916-917.
- 691 26. Department for Environment Food and Rural Affairs. Bovine spongiforme encephalopathy in  
692 Great Britain: confirmed cases by year of birth. (2008). - Adresse URL:  
693 <http://www.defra.gov.uk/animalh/bse/bse-statistics/bse/yrbirth.html> (consulté le 14 août 2008).
- 694 27. Detwiler L. (1992). - Scrapie. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz*, **11**, 491 - 537.
- 695 28. Dubois M., Fumière O., von Holst C. & Berben G. (2002). - Meat and bone meal detection in feed  
696 by search of specific animal DNA segments. In: 181th Meeting of the Belg Soc Biochem Mol Biol, 4  
697 May 2002, Katholieke Universiteit Leuven, Heverlee, Belgium, , Abstr. 7. Adresse URL: , consulté le  
698 5 /08/08.
- 699 29. European Food Safety Agency. (2005). - Opinion on the Quantitative risk assessment of the animal  
700 BSE risk posed by meat and bone meal with respect to the residual BSE risk. *The EFSA Journal*, **257**,  
701 1- 30.
- 702 30. European Food Safety Agency. (2007a). - Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards  
703 on the revision of the Geographical BSE risk assessment (GBR) methodology. *The EFSA Journal*,  
704 **463**, 1 - 35.

31. European Food Safety Agency. (2007b). - 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. *The EFSA Journal*, **466**, 1-10.
32. European Food Safety Agency. (2007c). - Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on Certain Aspects related to the Feeding of Processed Animal Proteins to Farm Animals. *The EFSA Journal*, **576**, 1-41.
33. European Food Safety Agency. (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 *The EFSA Journal*, **626**, 1-11.
34. Eurostat. Cheptels bovins (données annuelles). (2008). - Adresse URL : [http://epp.eurostat.ec.europa.eu/extraction/retrieve/fr/theme5/apro/apro\\_mt\\_lscatl?OutputDir=EJOutputDir\\_571&user=unknown&clientsessionid=EE6B6F6D0EC205174433F2A85726D786.extraction-worker-1&OutputFile=apro\\_mt\\_lscatl.htm&OutputMode=U&NumberOfCells=13&Language=fr&OutputMime=text%2Fhtml&](http://epp.eurostat.ec.europa.eu/extraction/retrieve/fr/theme5/apro/apro_mt_lscatl?OutputDir=EJOutputDir_571&user=unknown&clientsessionid=EE6B6F6D0EC205174433F2A85726D786.extraction-worker-1&OutputFile=apro_mt_lscatl.htm&OutputMode=U&NumberOfCells=13&Language=fr&OutputMime=text%2Fhtml&) (consulté le 05 août 2008).
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. *Journal of Chemometrics*, **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 Prot.*, **66**, 103-109.
37. Fulwyler M. & Mc Hugh T. (1990). - Flow microsphere immunoassay for the quantitative and simultaneous detection of multiple soluble analytes. *Methods 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. *Anal Bioanal 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. *Rev Sci.Tech. Off. Int. Epiz.*, **22**, 311-331.

737 40. Gizzi G., von Holst C., Baeten V., Berben G. & van Raamsdonk L. (2004). - Determination of  
738 processed animal proteins, including meat and bone meal, in animal feed. *J AOAC Int.*, **87**, 1334-1341.

739 41. Hauw J.J. Creutzfeldt-Jakob, une maladie orpheline. (2001) - Adresse URL: [http://bulletin.conseil-](http://bulletin.conseil-national.medecin.fr/Archives/html/204/204BOMN204P16A1.htm)  
740 [national.medecin.fr/Archives/html/204/204BOMN204P16A1.htm](http://bulletin.conseil-national.medecin.fr/Archives/html/204/204BOMN204P16A1.htm) (consulté le 5 août 2008).

741 42. Hill A., Desbruslais M., Joiner S., Sidle K., Gowland J., Collinge L., Doey L. & Lantos P. (1997) -  
742 The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature*, **389**, 448-450.

743 43. Hird H., Chisholm J., Sanchez A., Hernandez M., Goodier R., Schneede K., Boltz C. & Popping B.  
744 (2006) - Effect of heat and pressure processing on DNA fragmentation and implication for the  
745 detection of meat using a real-time polymerase chain reaction. *Food Addit Contam.*, **23**, 645-650.

746 44. Hofmann K. (1996) - Proof of proper heating at meat-and-bone meal. *Fleischwirtschaften*, **76**,  
747 1037-1039.

748 45. Hofmann K. (1997) - Safe controls for renewed confidence: the ELISA meat and bone meal.  
749 *Fleischerei*, 1997, **11**, 3-4.

750 46. Hsieh Y.-H. P., Zhang S., Chen F. & Sheu S. (2002) - Monoclonal Antibody-based ELISA for  
751 assessment of endpoint heating temperature of ground pork and beef. *J. Food Sci.*, **67**, 1149-1154.

752 47. Kim S., Huang T., Seymour T., Wei C., Kempf S., Bridgman C., Clemens R. & An H. (2004a) -  
753 Production of monoclonal antibody for the detection of meat and bone meal in animal feed. *J Agric.*  
754 *Food Chem.*, **52**, 7580-7585.

755 48. Kim S., Huang T., Seymour T., Wei C., Kempf S., Bridgman C., Clemens R. & An H. (2004b) -  
756 Identification of a biomarker for the detection of prohibited meat and bone meal residues in animal  
757 feed. *J. Food Sci.*, **69(9)**, 739-745.

758 49. Kim S., Huang T., Seymour T., Wei C., Kempf S., Bridgman C., Momcilovic D., Clemens R. &  
759 An H. (2005) - Development of immunoassay for detection of meat and bone meal in animal feed. *J.*  
760 *Food Prot.*, **68 (9)**, 1860-1865.

761 50. Kingombe C., Lüthi E., Schlosser H., Howald D., Kuhn M. & Jemmi T. (2001) - A PCR-based test  
762 for species-specific determination of heat treatment conditions of animal meals as an effective  
763 prophylactic method for bovine spongiform encephalopathy. *Meat Sci.*, **57**, 35-41.

764 51. Klein F., Lupo T., Pielack D. & Mozola M. (2005) - Validation study of a lateral-flow  
765 immunoassay for detection of ruminant by-product material in animal feeds and feed ingredients. *J*  
766 *AOAC Int.*, **88**, 1583-1592.

- 767 52. Krcmar P. & Rencova E. (2001) - Identification of bovine-specific DNA in feedstuffs. *J. Food*  
768 *Prot.*, **64**, 117-119.
- 769 53. Krcmar P. & Rencova E. (2003) - Identification of species-specific DNA in feedstuffs. *J. Agric.*  
770 *Food Chem.*, **51**, 7655-7658.
- 771 54. Krcmar P. & Rencova E. (2005) - Quantitative detection of species-specific DNA in feedstuffs and  
772 fish meals. *J. Food Prot.*, **68**, 1217-1221.
- 773 55. Lahiff S., Glennon M., O'Brien L., Lyng J., Smith T., Maher M. & Shilton N. (2001) - Species-  
774 specific PCR for the identification of ovine, porcine and chicken species in meat and bone meal. *Mol.*  
775 *Cell. Probes*, **15**, 27-35.
- 776 56. Lahiff S., Glennon M., Lyng J., Smith T., Shilton N. & Maher M. (2002) - Real-time polymerase  
777 chain reaction detection of bovine DNA in meat and bone meal samples. *J. Food Prot.*, **65**, 1158-1165.
- 778 57. Lasmezas C.I., Deslys J-P., Demaimay R., Adjou K, LamourY., Dormont D., Robain O., Ironside  
779 J. & Hauw J.-J. (1996) - BSE transmission to macaques. *Nature*, **381**, 743-744.
- 780 58. Lasmezas C. I., Fournier J. G., Nouvel V., Boe H., Marce D., LamourY F., Kopp N., Hauw J. J.,  
781 Ironside J., Bruce M., Dormont D. & Deslys J. P. (2001) - Adaptation of the bovine spongiform  
782 encephalopathy agent to primates and comparison with Creutzfeldt- Jakob disease: implications for  
783 human health. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **98**, 4142-4147.
- 784 59. Maudoux J.P. (2005) - Encéphalopathie spongiforme bovine : quel est le niveau de sécurité des  
785 aliments pour animaux mis sur le marché belge après l'entrée en vigueur de l'interdiction alimentaire  
786 étendue ?(Mémoire) AFSCA, Bruxelles, Belgique, 54p.
- 787 60. Mendoza-Romero L., Verkaar E. L. C., Savelkoul P. H., Catsbourg A., Aarts H. J. M., Buntjer J.  
788 B. & Lenstra J. (2004) - A. Real time PCR detection of ruminant DNA. *J. Food Prot.*, **67**, 550-554.
- 789 61. Michard J. & Ziebal R. (1999) - Mise au point d'une méthode microscopique de détection des  
790 farines de viande, d'os et de poisson dans les aliments pour animaux. *Annales de falsifications et de*  
791 *l'expertise chimique et toxicologique*, **92**, 209-223.
- 792 62. Michotte-Renier A., Baeten V., Sinnaeve G., Fernandez Pierna J.A. & Dardenne P. (2004) - The  
793 NIR camera: a new perspective for meat and bone meal detection in feedingstuffs. In: Davies AMC,  
794 Garrido-Varo A (eds) Near Infrared Spectroscopy: Proceedings of the 11<sup>th</sup> International Conference,  
795 NIR Publications, Chichester, UK, 1061-1065.

- 796 63. Miller J.C. & Miller J.N. (1988) - Limits of detection. *In*: Miller J.C., Miller J.N. Statistics for  
797 analytical chemistry. Second Edition, Ellis Horwood: Chichester, 115-117.
- 798 64. Momcilovic D. & Rasooly A. (2000) - Detection and analysis of animal materials in food and feed.  
799 *J. Food Prot.*, **63**, 1602-1609.
- 800 65. Murayama Y., Yoshioka M., Horii H., Takata M., Miura K. & Shinagawa M. (2006) - Specific  
801 detection of prion antigenic determinants retained in bovine meat and bone meal by flow microbead  
802 immunoassay. *J. Appl. Microbiol.*, **101**, 369-376.
- 803 66. Murray I., Aucott L.S. & Pike H. (2001) - Use of discriminant analysis on visible and near infrared  
804 reflectance spectra to detect adulteration of fishmeal with meat and bone meal. *J. Near Infrared*  
805 *Spectroscop.*, **9**, 297-311.
- 806 67. Murray I., Garrido-Varo A., Perez-Marin M.D., Guerrero J.E., Baeten V., Dardenne P., Termes S.,  
807 Zegers J. & Frankhuisen R. (2005) - Macroscopic near infrared reflectance spectroscopy (WP5). *In*  
808 Strategies and methods to detect and quantify mammalian tissues in feedingstuffs (Office for Official  
809 Publications of the European Communities) Luxembourg, 98-111. (Page web:  
810 [http://bookshop.europa.eu/eubookshop/FileCache/PUBPDF/KINA21124ENC/KINA21124ENC\\_002.](http://bookshop.europa.eu/eubookshop/FileCache/PUBPDF/KINA21124ENC/KINA21124ENC_002.pdf)  
811 pdf).
- 812 68. Myers M. J., Yancy H. F. & Farrell D. E. (2003) - Characterization of a polymerase chain reaction-  
813 based approach for the simultaneous detection of multiple animal-derived materials in animal feed. *J.*  
814 *Food Prot.*, **66**, 1085-1089.
- 815 69. Myers M. J., Yancy H. F., Farrell D. E., Washington J. D. & Frobish R. A (2005) - Evaluation of  
816 two commercial lateral-flow test kits for detection of animal proteins in animal feed. *J. Food Prot.*, **68**,  
817 2656-2664.
- 818 70. Myers M. J., Yancy H. F., Araneta M., Armour J., Derr J., Hoostelaere L.A., Farmer D., Jackson  
819 F., Kiessling W.M., Koch H., Lin H., Liu Y., Mowlds G., Pinero D., Riter K.L., Sedwick J., Shen  
820 Y., Wetherington J. & Younkins R. (2006) - Validation of a PCR-based method for detection of  
821 various rendered materials in feedstuffs using a forensic DNA extraction kit. *J. Food Prot.*, **69**, 205-  
822 210.
- 823 71. Ofori J. A. & Hsieh Y. H. (2007) - Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for the  
824 detection of bovine blood in animal feed. *J. Agric. Food Chem.*, **55 (15)**, 5919-5924.

- 825 72. Organisation Mondiale de la Santé Animale (OIE). Pays/territoires ayant signalé des cas d'ESB  
826 uniquement chez des animaux importés. (2005) – Adresse URL :  
827 [http://www.oie.int/eng/info/en\\_esbimport.htm](http://www.oie.int/eng/info/en_esbimport.htm) (consulté le 16 octobre 2008).
- 828 73. Organisation Mondiale de la Santé Animale (OIE). Répartition géographique des pays ayant  
829 déclarés des cas confirmés d'ESB depuis 1989. (2007). – Adresse URL:  
830 [http://www.oie.int/fr/info/fr\\_esbcarte.htm](http://www.oie.int/fr/info/fr_esbcarte.htm) (consulté le 16/10/2008).
- 831 74. Organisation Mondiale de la Santé Animale (OIE). Nombre de cas d'encéphalopathie spongiforme  
832 bovine (ESB) signalés chez les bovins d'élevage dans le monde\*, hors Royaume-Uni. (2008) –  
833 Adresse URL : [http://www.oie.int/eng/info/en\\_esbmonde.htm](http://www.oie.int/eng/info/en_esbmonde.htm) (consulté le 16 octobre 2008).
- 834 75. Piraux F. & Dardenne P. (2000) – Microscopie-NIR appliquée aux aliments du bétail. *Biotechnol.*  
835 *Agron. Soc. Environ.*, **4**, 226-232.
- 836 76. Prado M., Berben G., Fumière O., Van Duijn G., Mensinga-Kruize J., Reaney S., Boix A. & Von  
837 Holst C. (2007) – Detection of ruminant meat and bone meals in animal feed by real-time polymerase  
838 chain reaction: result of an interlaboratory study. *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 7495-7501.
- 839 77. Prusiner S. B. (1982) – Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, **216**, 136-  
840 144.
- 841 78. Quinn P. J., Boldyrev A. A. & Formazuyk V. E. (1992) – Carnosine: its properties, functions and  
842 potential therapeutic applications. *Mol. Aspects Med.*, **13**, 379-444.
- 843 79. Rao Q. (2004) – Monoclonal antibody-based sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for  
844 the detection of mammalian meat in meat and feed products. *Department of Nutrition, Food and*  
845 *Exercise Sciences in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science*, 70p.
- 846 80. Rensen G., Smith W., Ruzante J., Sawyer M., Osburn B. & Cullor J. (2005) – Development and  
847 evaluation of a real-time fluorescent polymerase chain reaction assay for the detection of bovine  
848 contaminants in cattle feed. *Foodborne Pathog. Dis.*, **2**, 152-159.
- 849 81. Schönherr J. (2002) – Analysis of products of animal origin in feeds by determination of carnosine  
850 and related dipeptides by high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 1945-  
851 1950.
- 852 82. Sigurdson C. J. & Miller M. W. (2003) – Other animal prion diseases. *Br Med Bull.*, **66**, 199-212.
- 853 83. Tajima K., Enishi O., Amari M., Mitsumori M., Kajikawa H., Kurihara M., Yanai S., Matsui H.,  
854 Yasue H., Mitsuhashi T., Kawashima T. & Matsumoto M. (2002) – PCR detection of DNAs of animal



855 origin in feed by primers based on sequences of short and long interspersed repetitive elements. *Biosci*  
856 *Biotechnol Biochem.*, **66**, 2247-2250.

857 84. Tartaglia M., Saulle E., Pestalozza S., Morelli L., Antonucci G. & Battaglia P. (1998) – A.  
858 Detection of bovine mitochondrial DNA in ruminant feeds: a molecular approach to test for the  
859 presence of bovine-derived materials. *J. Food Prot.*, **61**, 513-518.

860 85. Toma B., Benet J.J., Dufour B., Eloit M., Moutou F. & Sanaa M. (1991) – Glossaire  
861 d'épidémiologie animale, Editions du point vétérinaire, Maisons-Alfort, 365p.

862 86. Toorop M. R., Murch S. J. & Ball R.O. (1997) – Development of a rapid and accurate method for  
863 separation and quantification of myofibrillar proteins in meat. *Food Res. Int.*, **30**, 619-627.

864 87. Union Européenne (UE) (1993)- Décision 93/256/CE de la Commission, du 14 avril 1993, arrêtant  
865 les méthodes à utiliser pour la recherche de résidus et de substances à effet hormonal et de substances  
866 à effet thyrostatique. *Off J Eur Communities*, 1993, **L 118**, 64-74.

867 88. Union Européenne (UE) (1994). - Décision 94/381/CE de la Commission, du 27 juin 1994,  
868 concernant certaines mesures de protection relatives à l'encéphalopathie spongiforme bovine et à  
869 l'alimentation à base de protéines dérivées de mammifères. *Off J Eur Communities*, **L 172**, 23-24.

870 89. Union Européenne (UE) (1998a). - Directive 98/67/CE de la Commission, du 7 septembre 1998,  
871 modifiant les directives 80/511/CEE, 82/475/CEE, 91/357/CEE et la directive 96/25/CE du Conseil et  
872 abrogeant la directive 92/87/CEE (1). *Off J Eur Communities*, **L 261**, 10-31.

873 90. Union Européenne (UE) (1998b). - Directive 98/88/CE de la Commission du 13 novembre 1998  
874 établissant les lignes directrices pour l'identification et l'estimation, par examen microscopique, des  
875 constituants d'origine animale pour le contrôle officiel des aliments pour animaux. *Off. J. Eur.*  
876 *Communities*, **L 318**, 45-50.

877 91. Union Européenne (UE) (1999). - Décision du Conseil 1999/534/EC, du 19 juillet 1999,  
878 concernant les mesures applicables au traitement de certains déchets animaux aux fins de la protection  
879 contre les encéphalopathies spongiformes transmissibles, et modifiant la décision 97/735/CE de la  
880 Commission. *Off J Eur Communities*, **L 204**, 37-42.

881 92. Union Européenne (UE) (2000). - Décision 2000/766/CE du Conseil du 4 décembre 2000 relative  
882 à certaines mesures de protection à l'égard des encéphalopathies spongiformes transmissibles et à  
883 l'utilisation de protéines animales dans l'alimentation des animaux. *Off. J. Eur. Communities*, **L 306**,  
884 32-33.

885 93 Union Européenne (UE) (2001a). - Décision de la Commission N°(2001/9/CE) du 29 décembre  
886 2000 relative aux mesures de contrôle requises pour la mise en œuvre de la décision 2000/766/CE du  
887 Conseil relative à certaines mesures de protection à l'égard des encéphalopathies spongiformes  
888 transmissibles et à l'utilisation de certaines protéines animales dans l'alimentation des animaux. *Off. J.*  
889 *Eur. Communities*, **L 2**, 32-40.

890 94 Union Européenne (UE) (2001b). - Règlement (CE) n° 999/2001 du Parlement européen et du  
891 Conseil du 22 mai 2001 fixant les règles pour la prévention, le contrôle et l'éradication de certaines  
892 encéphalopathies spongiformes transmissibles. *Off. J. Eur. Communities*, **L 147**, 1-40.

893 95 Union Européenne (UE) (2002a). - Règlement (CE) n° 178/2002 du Parlement européen et du  
894 Conseil du 28 janvier 2002 établissant les principes généraux et les prescriptions générales de la  
895 législation alimentaire, instituant l'Autorité européenne de sécurité des aliments et fixant des  
896 procédures relatives à la sécurité des denrées alimentaires. *Off. J. Eur. Communities*, **L 31**, 1-24.

897 96. Union Européenne (UE) (2002b). - Règlement (CE) n° 1774/2002 du Parlement européen et du  
898 Conseil du 3 octobre 2002 établissant des règles sanitaires applicables aux sous-produits animaux non  
899 destinés à la consommation humaine. *Off. J. Eur. Communities*, **L 273**, 1-95.

900 97. Union Européenne (UE) (2003). - Recommandation 2003/91/CE de la Commission du 10 février  
901 2003 relative au programme coordonné d'inspection dans le domaine de l'alimentation des animaux  
902 pour l'année 2003 conformément à la directive 95/53/CE du Conseil. *Off. J. Eur. Communities*, **L 34**,  
903 20-25.

904 98. Union Européenne (UE) (2007). - Règlement (CE) N°1432/2007 de la Commission du 5 décembre  
905 2007 modifiant les annexes I, II et VI du règlement (CE) N° 1774/2002 du Parlement européen et du  
906 Conseil en ce qui concerne le marquage et le transport de sous-produits animaux. *Off. J. Eur.*  
907 *Communities*, **L 320**, 13-17.

908 99. Union Européenne (UE) (2008). - Règlement (CE) N° 315/2008 de la Commission du 4 avril 2008  
909 modifiant l'annexe X du règlement (CE) n° 999/2001 du Parlement européen et du Conseil en ce qui  
910 concerne les listes de tests rapides (Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE) *Off. J. Eur. Communities*,  
911 **L 94**, 3-5.

912 100. Union Européenne (UE) (2008b). - Règlement (CE) n° 357/2008 de la Commission du 22 avril  
913 2008 modifiant l'annexe V du règlement (CE) n° 999/2001 du Parlement européen et du Conseil  
914 fixant les règles pour la prévention, le contrôle et l'éradication de certaines encéphalopathies  
915 spongiformes transmissibles (Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE). *Off. J. Eur. Communities*,  
916 **L 111**, 3-4.

917 101. Union Européenne (UE) (2009). Règlement (EC) N° 152/2009 de la Commission du 27 Janvier  
918 2009 portant fixation des méthodes d'échantillonnage et d'analyse destinées au contrôle officiel des  
919 aliments pour animaux. *Off. J. Eur. Communities*, L 54, 1-130.

920 102 . Union Européenne (UE) (2009). - Règlement (CE) n° 220/2009 du Parlement européen et du  
921 conseil du 11 mars 2009 modifiant le règlement (CE) n° 999/2001 fixant les règles pour la prévention,  
922 le contrôle et l'éradication de certaines encéphalopathies en ce qui concerne les compétence  
923 d'exécution conférées à la commission. *Off. J. Eur. Communities*, L 87, 155–156.103. Van  
924 Raamsdonk L.W.D. & Van der Voet H.J. (2003) – A ring trial for the detection of animal tissues in  
925 feeds in the presence of fish meal, Report 2003.012, RIKILT, Wageningen, pp 17 avec 6 annexes.

926 104. Van Raamsdonk L.W.D., von Holst C., Baeten V., Berben G., Boix A. & de Jong J. (2007) –  
927 New developments in the detection and identification of processed proteins in feeds. *J. Ani. Feed Sci.*,  
928 **133**, 63-83.

929 105. Veys P. & Baeten V. (2007) – CRL-AP Interlaboratory study 2006 Final report, Gembloux,  
930 Belgium, 23p.

931 106. Veys P. & Baeten V. (2008) – CRL-AP Interlaboratory study 2007 Final report, Gembloux,  
932 Belgium, 26p.

933 107. Veys P., Berben G. & Baeten V. (2007) – CRL-AP Proficiency Test 2007 Final report,  
934 Gembloux, Belgium, 14p.

935 108. Von Holst C. & Anklam E. (1999) – Final report method for the detection of bovine  
936 mitochondrial DNA in animal feedingstuffs of plant origin. Final report of the competitive support  
937 project N° 86-7920/97/000008 Part 2- Validation study. Joint Research Centre, Ispra, Italie, 35p.

938 109. Von Holst C., Honikel K. O., Unglaub W., Kramer G. & Anklam E. (2000) – Determination of an  
939 appropriate heat treatment of animal waste using the ELISA technique: results of a validation study.  
940 *Meat Sci.*, **54**, 1-7.

941 110. Von Holst C., Unglaub W. & Anklam E. (2001) – Post process product control of rendering plant  
942 sterilization conditions by ELISA. *J. AOAC Int.*, **84**, 1793-1798.

943 111. Von Holst C., Baeten V., Berben G. & Brambilla G. Overview of methods for the detection of  
944 species specific proteins in feed intended for farmed animals. (2004). – Adresse URL:  
945 [http://ec.europa.eu/comm/food/food/biosafety/bse/bse52\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/comm/food/food/biosafety/bse/bse52_en.pdf) (consulté le 5 août 2008).

946 112. Von Holst C., Boix A., Baeten V., Vancutsem J. & Berben G. (2006). – Determination of  
947 processed animal proteins in feed: The performance characteristics of classical microscopy and  
948 immunoassay methods. *Food Addit Contam.*, **23**, 252-264.

949 113. Wang R. F., Myers M. J., Campbell W., Cao W. W., Paine D. & Cerniglia C. E. (2000). – A rapid  
950 method for PCR detection of bovine materials in animal feedstuffs. *Mol. Cell. Probes*, **14**, 1-5.

951 114. Wells G. A., Scott A. C., Johnson C. T., Gunning R. F., Hancock R. D., Jeffrey M., Dawson M.,  
952 Bradley R. (1987). – A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet. Rec.*, **121**, 419-  
953 420.

954 115. Wells G. A. H., Konold T., Arnold M. E., Austin A. R., Hawkins S. A. C., Stack M. J., Simmons  
955 M. M., Lee Y. H., Gavier-Widen D., Dawson M. & Wilesmith J. W. (2007). – Bovine spongiform  
956 encephalopathy: the effect of oral exposure dose on attack rate and incubation period in cattle. *J. Gen.*  
957 *Virol.*, **88**, 1363-1373.

958 116. Wilesmith J. W., Wells G. A. H., Cranwell M. P. & Ryan J. B. M. (1988). – Bovine spongiform  
959 encephalopathy: epidemiological studies. *Vet. Rec.*, **123**, 638-644.

960 117. Wilesmith J. W., Ryan J. B. M. & Atkinson M. J. (1991). – Bovine spongiform encephalopathy:  
961 epidemiological studies on the origin. *Vet. Rec.*, **128**, 199-203.

962 118. Will R. G., Ironside J. W., Zeidler S., Cousens S. N., Estibeiro K., Alperovitch A., Poser S.,  
963 Pocchiari M., Hofmann A. & Smith P. G. (1996). – A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the  
964 UK. *Lancet*, **347**, 264-267.

965

966 119. Yancy H. F., Mohla A., Farrell D.E. & Myers M.J. (2005). – Evaluation of a rapid PCR-based  
967 method for the detection of animal material. *J. Food. Prot.*, **68**, 2651-2655.

968

969 **LISTE DES ABREVIATIONS**

<b>Ac :</b>	Anticorps	<b>NIR camera :</b>	<i>Near Infra-Red camera</i>
<b>Acm :</b>	Anticorps monoclonal	<b>NIRM :</b>	<i>Near Infra Red Microscopy</i>
<b>Acp :</b>	Anticorps polyclonal	<b>NIRS :</b>	<i>Near Infra Red Spectroscopy</i>
<b>ADN :</b>	Acide DésoryriboNucléique	<b>PAT :</b>	Protéines Animales Transformées
<b>ADNc :</b>	Acide DesoxyriboNucléique complémentaire	<b>PCR :</b>	Réaction de polymérisation en chaîne ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
<b>AFSCA :</b>	Agence Fédérale pour la Sécurité de la Chaîne Alimentaire	<b>PrP :</b>	Protéine Prion
<b>Ag :</b>	Antigène	<b>PrPres :</b>	Protéine prion résistante à la protéinase K
<b>ARN :</b>	Acide RiboNucléique	<b>PrPsc :</b>	Isoforme anormale de la protéine prion
<b>EURL-AP :</b>	Laboratoire de Référence Communautaire pour les protéines animales	<b>PrPres :</b>	Protéine Prion résistante à la protéinase K
<b>CRA-W :</b>	Centre de Recherche Agronomique Wallon	<b>Q-PCR :</b>	PCR Quantitative
<b>Ct :</b>	Nombre de cycles nécessaires pour atteindre un niveau défini de fluorescence relative permettant la détection du signal, à une température définie	<b>RFLP-PCR :</b>	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> PCR
<b>Dir :</b>	Directive européenne	<b>rtPCR :</b>	PCR en temps réel
<b>ELISA :</b>	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>	<b>Se:</b>	Sensibilité
<b>ESB :</b>	Encéphalopathie Spongiforme Bovine	<b>Sp:</b>	Spécificité
<b>EST :</b>	Encéphalopathie Spongiforme Transmissible	<b>SNC :</b>	Système Nerveux Central
<b>Fc :</b>	Fragment d'Anticorps correspondant à la fraction constante	<b>TnI :</b>	Troponine I
<b>FN :</b>	résultat Faux Négatif	<b>TTL :</b>	Traitement Thermique Légal
<b>FP :</b>	résultat Faux Positif	<b>vMCJ :</b>	Nouveau variant de la Maladie de Creutzfeld-Jakob
<b>FVO :</b>	Farine de viandes et d'os	<b>VN :</b>	résultat Vrai Négatif
<b>GTH :</b>	TriHeptanoate de Glycerol	<b>VP :</b>	résultat Vrai Positif
<b>HPLC :</b>	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>	<b>VPN :</b>	Valeur Prédictive Négative
<b>IR :</b>	Infra-Rouge	<b>VPP :</b>	Valeur Prédictive Positive
<b>LNR :</b>	Laboratoire National de Référence		
<b>LOD :</b>	Limite de Détection		
<b>LOQ :</b>	Limite de Quantification		
<b>MBM :</b>	<i>Meat and Bone Meal</i>		
<b>MCJ :</b>	Maladie de Creutzfeld-Jakob		
<b>MO :</b>	Microscopie Optique		
<b>MRS :</b>	Matériels à Risque Spécifiés		

# TABLEAUX

## I. TABLEAUX

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

Légende :

☐ : interdit

☒ : autorisé

**Tableau II.** Table de critères d’observation par MO de particules d’os issus de différentes espèces animales (39)

Espèce	Critères visuels				
	Os	Lacunes	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	Ecailles, arrêtes, bras

**Tableau III.** Différences entre le FeedChek® et le Reveal® concernant la détection de protéines animales dans l'alimentation des animaux (69)

Paramètre		Reveal®	Feedcheck®
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	
	à 2% BMBM		
	à 1% LM		
	à 2% LM		
	à 1% RMBM		
	à 2% RMBM		
Précision de détection globale		Insuffisant	Suffisant
Sensibilité		100%	62-66%
Faux-positif (1-spécificité)		0%	34-38%
Temps d'attente avant lecture		>10min (20min)	3min
Fenêtre de lecture		-	3 à 5min
Archivage électronique		Non	Non

**Légende :**

BMBM : *bovine meat and bone meal*; farine de viandes et d'os d'origine bovine

LM : *lamb meal*; farines de moutons

RMBM : *ruminant meat and bone meal* ; farines de viandes et d'os d'origine de ruminants



**Tableau IV.** Table d'interprétation des résultats obtenus à partir du FeedChek® et du Reveal® dans l'alimentation animale (69)

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

Légende :

(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: *ruminant meat and bone meal* ; farines de viandes et d'os d'origine de ruminants

FVO : farines de viandes et d'os

PM : protéines de mammifères

PA : protéines animales

43 **Tableau V.** Liste des anticorps monoclonaux anti-Troponine utilisés pour la détection immunologique des protéines animales d'espèces différentes dans  
44 l'alimentation du bétail (21, 22).

Groupe	Acm anti-TnI	Isotype d'Ac	Spécificité d'espèces										Affinité Envers l'espèce cible
			Bovin	Ovin	Cervidés	Porc	Equin	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

45

46 **Légende :**

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

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

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

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

52 IV : groupe d'Ac monoclonaux ne reconnaissant que les TnI de ruminants domestiques (bovin et ovin)

53 + : détection

54 - : non détection

55

56

57

58 **Tableau VI. Comparatif des principales techniques de détection de la présence de protéines animales transformées dans l'alimentation du bétail en**  
59 **Europe**

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 ®		BV-RMT	0,1 %	-
	Etude comparative	127 à 134°C	MM	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 ME BV + SgBV TTL mlBV	0,2 % 0,3-2 % 0,05-0,5 % 0,05 %	-
PCR	Validation interlaboratoire	133°C durant 33 min et autoclavage ou 125-131°C durant 30min ou 133°C durant 20 min à 3 bars	BMBM, LM, PMBM RMT BV, OV, PC, PLT CP RMT, PC,PLT BV OV, PC, VOL	0,1 % 0,1 % 0,125 % 0,125 % BMBM 0,01 – 0,001 % 0,5 % 0,3 à 1 % Max < 2 %	271 pb, 225 pb, 68 pb, 231 pb 271, 40, 147 pb 181 pb
	Kit légal pour extraction de l'ADN				
Q-PCR	Etude interlaboratoire	133°C durant 20 min à 3 bars ou 133°C durant 40 min à 2 bars ou 134°C durant 3 à 20min	RMBM, PMBM, CMBM	0,1 % 0,01 % 0,05 %	271 pb 111-145 pb 57-60 pb
Multiplex PCR	-	130°C durant 20 min	RMT, LMBM, CP, mélange de dinde, PC et BV	0,25 %	-
RFLP-PCR	-	130°C durant 20 min	RMT, PC, CV	0,5 %	359 pb
NIRM-PLS	-	TTL	Toutes espèces	0,05 %	-
NIRS	-	TTL	Toutes espèces	-	-
NIRcamera	-	TTL	Toutes espèces	0,1 %	-

60

61 Légende :

62 Ag : antigènes ; BMBM : farine de viande et d'os d'origine bovine ; bp : paires de bases ; BV : bovin ; CC : contamination croisée ; CP : caprin ; EIA : test immunologique utilisant la liaison à un enzyme ; FM : farines  
63 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  
64 viande et d'os ; ME : multi-espèces ; mlBV : muscle lisse de bovin ; MM : mammifères ; MMBM : *mammalian meat and bone meal*, farines de viandes et d'os d'origine de mammifères ; NE : norme européenne ; OV :  
65 ovin ; NIRM : *near infrared microscopy* , microscopie proche infrarouge; PA : pression atmosphérique ; PC : porcs ; PLT : poulet ; PMBM : farines de viande et d'os d'origine porcine ; RMT : ruminants (domestiques  
66 et sauvages) ; Se : sensibilité ; SgBV : sang de bovin ; Sp : spécificité ; TTL : traitement thermique légal ; VOL : volaille.

67

## **II. FIGURES**

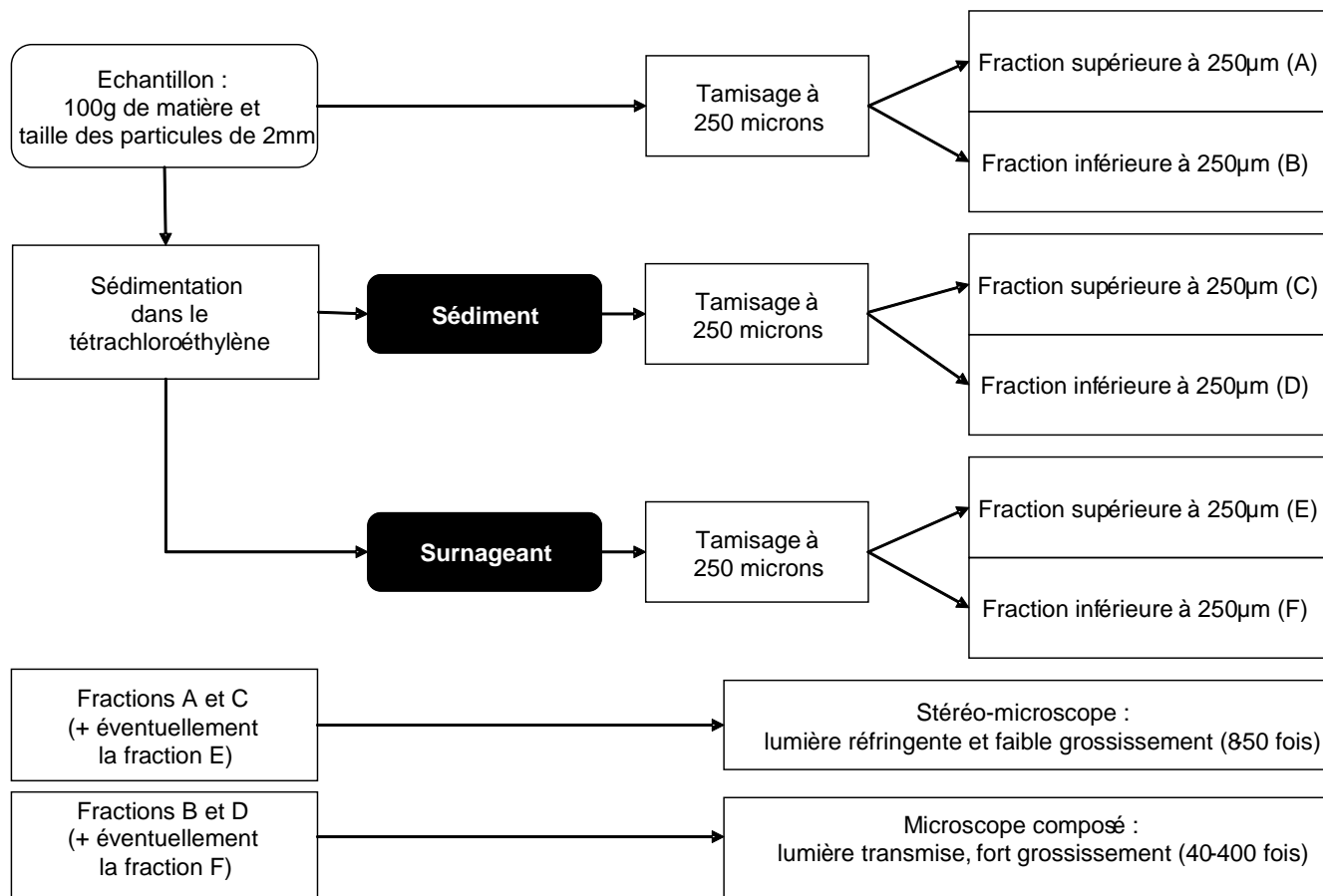
**Figure 1.** Protocole d'analyse pour la microscopie optique (103)

**Figure 2.** Schéma de testage envisageable pour améliorer la détection des farines animales dans l'alimentation du bétail

\* 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.

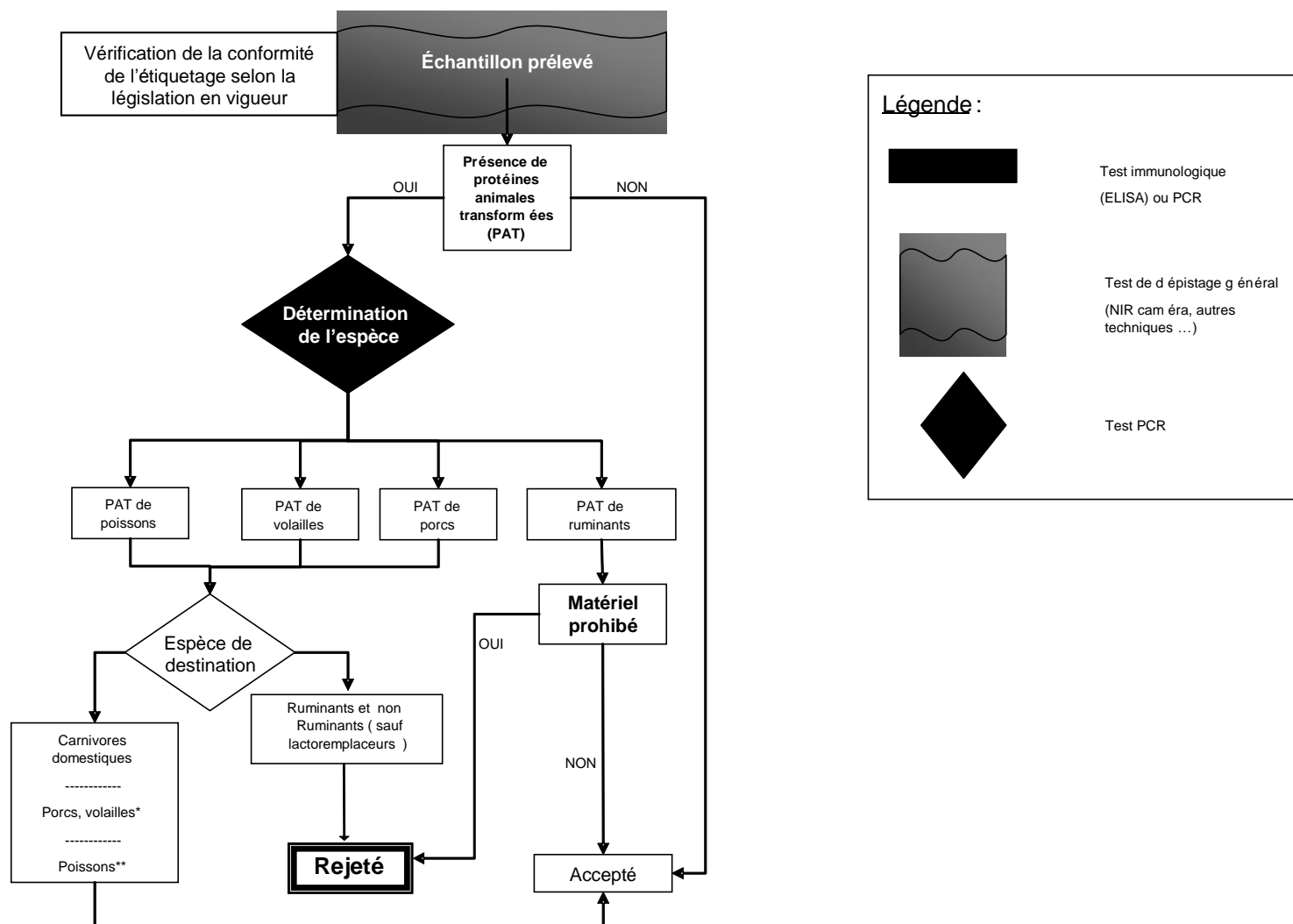
79 **Figure 1.** Protocole d'analyse pour la microscopie optique (103)



80

81

82 Figure 2. Schéma de testage envisageable pour les protéines animales transformées



83