

# 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>

5  
6 (1) Epidémiologie et Analyse de risques appliquées aux Sciences vétérinaires (UREAR-ULg),  
7 Département des maladies infectieuses et parasitaires, Faculté de Médecine Vétérinaire,  
8 Université de Liège, Boulevard de Colonster 20, B42, B-4000 Liège, Belgique

9 (2) Centre wallon de Recherches agronomiques, Département valorisation des productions  
10 agricoles, Unité Qualité des produits, Chaussée de Namur 24, B-5030 Gembloux, Belgique

11 (3) Agence fédérale pour la Sécurité de la Chaîne alimentaire, CA Botanique, Food Safety  
12 Center, Boulevard du Jardin Botanique 55, B-1000 Bruxelles, Belgique

13 (4) Centre d'Etude et de Recherches Vétérinaires et Agrochimiques, Groeselenberg 99, B-1180,  
14 Uccle, Belgique

15 (5) Département de Santé Animale, Institut de Médecine Tropicale Prince Leopold,

16 Nationalestraat 155, B-2000 Anvers, Belgique

17 (6) Service d'Analyse des Denrées Alimentaires, Département des denrées alimentaires, Faculté  
18 de Médecine Vétérinaire, Université de Liège, Boulevard de Colonster 20, B43bis, B-4000  
19 Liège, Belgique

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

23

24

25 **Détection des protéines animales transformées : expérience et perspectives**  
26 **européennes**

27 **Résumé**

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

38 **Mots-clés :** encéphalopathie spongiforme bovine, farines animales, protéines animales transformées,  
39 éléments en traces, contaminations croisées, techniques de détection.

40

41

42     **1. INTRODUCTION**

43     Les Encéphalopathies Spongiformes Transmissibles (EST) sont des maladies dégénératives du  
44     système nerveux central (SNC). Elles se retrouvent dans de nombreuses espèces animales comme chez  
45     le bovin, où elle porte le nom d'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) (114). Chez l'homme, il y  
46     a notamment la maladie de Creutzfeld-Jakob (MCJ) et son nouveau variant (vMCJ) (118). L'agent  
47     responsable des EST a été découvert par Stanley Prusiner (77). Il s'agit d'une protéine infectieuse  
48     nommée « prion », forme contractée de *proteinaceous infectious particle*. En 1986, l'ESB a été  
49     reconnue cliniquement comme une nouvelle pathologie neurodégénérative en Grande Bretagne et,  
50     ultérieurement, a été la cause des nouveaux cas du vMCJ, (114). Cependant, il ne peut pas  
51     actuellement être exclu, en raison de leur diversité, que des EST animales autres que l'ESB, puissent  
52     être transmissibles à l'homme (31, 33). La situation mondiale actuelle concernant l'ESB est  
53     visualisable sur le site de l'Organisation Mondiale de la Santé Animale (73).

54     La cause la plus probable de la crise de l'ESB est l'alimentation des bovins avec des farines de viandes  
55     et d'os (FVO) ou farines animales contaminées par de la protéine prion résistante à la protéinase K  
56     ( $\text{PrP}^{\text{res}}$ ) (116, 117). Ces FVO permettent d'enrichir à faible coût les concentrés en calcium et  
57     phosphore et acides aminés essentiels pour les animaux en lactation ou en croissance. Au Royaume-  
58     Uni, épicentre de la crise, les premiers cas cliniques confirmés d'ESB sont apparus durant les années  
59     80 (26) suite à une modification de procédure de production des FVO au cours des années 70 pour des  
60     raisons économiques et sécuritaires en supprimant les solvants organiques utilisés pour extraire les  
61     graisses et le nettoyage des farines à la vapeur (traitement thermique à 125°C en phase humide utilisé  
62     pour éliminer les traces de solvants). Cependant aucune procédure pour la fabrication de FVO ne  
63     permet d'inactiver complètement la  $\text{PrP}^{\text{res}}$  (89). C'est pour cela que l'interdiction des protéines  
64     animales transformées (PAT) dans l'alimentation des ruminants fut instaurée : elle fut tout d'abord  
65     décrise dans la Décision n° 1994/381/CE (88), puis elle s'est élargie à tous les animaux d'élevage  
66     destinés à la consommation humaine pour devenir une interdiction alimentaire étendue (*total meat-*  
67     *and-bone meal ban, total MBM ban*), qui a pris effet au 1<sup>er</sup> janvier 2001 (92). Les farines de poisson  
68     sont également interdites dans l'alimentation des ruminants depuis le 1<sup>er</sup> janvier 2001 (93) excepté

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

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

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

89 **2. OBJETS, ECHANTILLONNAGE, LIEU D'ANALYSE ET**  
90 **EXPRESSION DES RESULTATS**

91 **2.1. Objet de la détection**

92 La détection a pour objet les PAT qui sont des protéines animales dérivées entièrement de la  
93 catégorie 3, c'est à dire des sous-produits d'animaux destinés à la consommation humaine. En accord  
94 avec la législation européenne, ces protéines animales de catégorie 3 sont, après une transformation,

95      directement utilisables comme matière première pour les animaux de compagnie (pet food). Le terme  
96      PAT n'inclut pas les produits dérivés de sang, du lait et des produits à base de lait, du colostrum, de la  
97      gélatine, des protéines hydrolysées, du phosphate dicalcique, des œufs et dérivés d'œufs, du phosphate  
98      tricalcique et du collagène (92). Il existe deux autres catégories de sous produits animaux : des déchets  
99      issus de carcasses impropres à la consommation humaine (catégorie 1) ou douteuses (catégorie 2). Les  
100     différentes catégories 1, 2 et 3 sont définies respectivement dans les articles 4, 5, 6 du règlement (CE)  
101     n°1774/2002 (96). En outre, la législation européenne impose le traitement thermique des PAT à  
102     133°C, pendant 20 minutes et à une pression de 3 bars, sur des particules dont la taille n'excède pas 5  
103     cm (91, 96). Les différentes catégories sont marquées d'un code de couleur : la couleur noire est  
104     utilisée pour marquer les sous-produits de la catégorie 1, la couleur jaune pour la catégorie 2 et la  
105     couleur verte pour la catégorie 3. Les catégories 1 et 2 sont additionnées d'une odeur et d'un marquage  
106     indélébile au triheptanoate de glycérol (GTH) sauf exception, et applicable depuis le 1<sup>er</sup> juillet 2008  
107     comme stipulé dans le Règlement européen (CE) n°1432/2007 (98).

108

## 109    **2.2. L'échantillonnage**

110    L'échantillonnage imposé par la législation européenne doit être représentatif du marché de  
111    l'alimentation animale d'un Etat membre. Pour la première fois en 2003, une recommandation  
112    européenne (98) fixait la fréquence minimale d'échantillonnage des aliments pour animaux à 20 par  
113    100.000 tonnes produites. Pour la Belgique, par exemple, cela représente un total de 1200 échantillons  
114    à prélever portant sur des matières premières et des aliments composés. Cette recommandation fixait  
115    également la fréquence minimale d'inspection des établissements à 10 par 100.000 tonnes produites,  
116    soit 600 inspections. La répartition des échantillons est établie en appliquant un facteur de pondération  
117    qui tient compte du risque encouru par type d'aliment (matières premières, aliments composés,  
118    prémélanges). Les aliments composés se retrouvent avec une pression d'échantillonnage supérieure à  
119    celle des matières premières. Les échantillons prélevés par les inspecteurs de l'Agence Fédérale pour  
120    la Sécurité de la Chaîne Alimentaire (AFSCA) visent tous les stades de la production, de la  
121    fabrication, les stades intermédiaires, la mise en circulation ainsi que l'utilisation des aliments pour

122 animaux mis sur le marché belge, échangés sur le marché communautaire ou exportés vers les pays  
123 tiers en vue de détecter la présence éventuelle de protéines animales prohibées (59).  
124 Les contaminations croisées doivent également être surveillées grâce à un plan d'échantillonnage  
125 aléatoire pour vérifier l'absence de ce type de contamination. La taille de l'échantillon collecté est  
126 imposée. Toutefois, la quantité par échantillon acheminé au laboratoire peut varier (76) et peut parfois  
127 poser des problèmes de représentativité par rapport aux lots d'aliments échantillonnés.

128

### **2.3. Lieu d'analyse et expression des résultats**

130 En Belgique, les différents échantillons obtenus sont analysés par MO dans deux laboratoires  
131 accrédités pour la détection de PAT situés à Liège et à Tervuren. L'accréditation consiste en  
132 l'émission d'une attestation par une tierce partie qui est un organisme d'évaluation de la conformité.  
133 Cette attestation apporte la démonstration formelle de la compétence de l'organisme à exécuter des  
134 tâches spécifiques d'évaluation de la conformité. Le laboratoire de Tervuren est également le  
135 laboratoire national de référence (LNR) qui valide les résultats transmis par les autres laboratoires  
136 accrédités. Le Laboratoire de Référence de l'Union Européenne pour la détermination des protéines  
137 animales dans l'alimentation des animaux (EURL-AP) est situé au Centre wallon de Recherches  
138 agronomiques à Gembloux (Belgique). Il est en activité depuis 2006 et encadre l'ensemble des  
139 différents LNR européens pour la détection des traces de farines animales. Il a également en charge la  
140 formation et la guidance technique des LNR. D'autre part, il organise des tests inter-laboratoires afin  
141 de standardiser les résultats de chaque LNR. Il joue également un rôle de contre-expertise à la  
142 demande du LNR ou de la commission européenne.

143

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

145 Les tests inter-laboratoires permettent d'évaluer les résultats des laboratoires nationaux pour différents  
146 paramètres : exactitude, sensibilité, spécificité, vrai résultat positif, vrai résultat négatif, faux résultat  
147 positif, faux résultat négatif, valeur prédictive d'un résultat positif, valeur prédictive d'un résultat  
148 négatif. L'exactitude est la qualité de l'accord entre l'estimation de la valeur mesurée et la valeur vraie

149 (85). Les tests utilisés dans les LNR sont des méthodes de référence et ont des valeurs de Se et de Sp  
150 définies légalement afin de minimiser au maximum les FP et les FN.

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

156 La limite de détection (*Limit Of Detection, LOD*) est la teneur minimale mesurée à partir de laquelle il  
157 est possible de déduire la présence de l'analyte avec une certitude statistique raisonnable (au moins  
158 95% pour les substances non autorisées). La limite de quantification (*Limit Of Quantification, LOQ*)  
159 ou limite de détermination est la plus petite concentration d'analyte pour laquelle la méthode a été  
160 validée avec une exactitude et une précision spécifiées (87, 63). Une technique idéale doit avoir une  
161 LOD la plus basse possible afin de pouvoir également descendre la LOQ. La précision de la méthode  
162 englobe la reproductibilité et la répétabilité. La reproductibilité est le degré de concordance entre les  
163 résultats de tests indépendants, obtenus avec une fraction à analyser identique, dans des laboratoires  
164 différents, par des opérateurs différents ou avec des équipements différents. La répétabilité est le degré  
165 de concordance entre les résultats d'analyses indépendantes, obtenus avec une fraction à analyser  
166 identique, dans le même laboratoire, par le même opérateur, avec le même équipement et à des  
167 intervalles de temps très courts (87).

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

170

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

172 Le Règlement européen 152/2009/CE (101) impose comme unique méthode officielle la MO qui a été  
173 validée par une étude intercomparative effectuée en 2003 (39). Elle détecte les ingrédients d'origine  
174 animale grâce à une observation microscopique des caractéristiques spécifiques des particules  
175 résultantes de l'échantillon tel quel, de la fraction sédimentée et de la fraction surnageant après

176 préparation des échantillons (**Figure 1**). L'échantillon tel quel ou/et le flotat peuvent être observés  
177 dans une solution d'iodure de potassium, soluté donnant une coloration rouge-orange aux structures  
178 contenant des protéines (principalement les muscles). Elle nécessite un personnel ayant une bonne  
179 expérience pour la reconnaissance des particules caractéristiques (39). Cette méthode permet le  
180 discernement visuel entre des particules d'os d'origine d'animaux terrestres et de poisson. En effet, la  
181 forme des lacunes présentes et d'autres éléments discriminants tels que les écailles permettent de  
182 différencier ces deux groupes. (**Tableau II**).

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

189 A partir du 1<sup>er</sup> juillet 2004, seule la technique officielle à un solvant a été autorisée pour le contrôle des  
190 farines animales (101). Bien que donnant toutes deux des résultats satisfaisants, la méthode standard  
191 apporte une meilleure performance de détection que la méthode à deux solvants en présence de farine  
192 de poisson (112). Actuellement, seule la méthode officielle à un solvant est utilisée par les LNR et l'  
193 EURL-AP.

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

198

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

200 La détection des PAT peut être également envisagée par la recherche d'ADN ou de protéines  
201 spécifiques (voire de la PrP<sup>sc</sup>). Les différentes techniques abordées ci-dessous ont été développées afin  
202 de suppléer la méthode officielle qui présente certaines limitations et de proposer un schéma de

203 contrôle possible pour améliorer la Se et de la Sp de la technique de détection des PAT dans  
204 l'alimentation du bétail en Belgique.

205

206 **4.1. La chromatographie.** Les techniques chromatographiques pour l'identification d'espèces et  
207 la détection de tissus animaux dans l'alimentation animale peuvent être classées en  
208 chromatographie gazeuse, chromatographie liquide et chromatographie liquide à haute  
209 performance (HPLC). En fonction de la technique de séparation des protéines, l'HPLC est  
210 subdivisée en HPLC échangeuse de cations, HPLC échangeuse d'anions, HPLC par exclusion  
211 de taille et HPLC en phase inverse. Les protéines myofibrillaires étudiées par HPLC par  
212 exclusion de taille permettent de différencier des protéines de bœuf, d'agneau, de veau, de  
213 porc, et de dinde à condition qu'il s'agisse d'échantillons purs (86). Celle-ci permet de  
214 calculer le ratio entre deux dipeptides, la carnosine et l'ansérine. Ces dipeptides sont présents  
215 dans les muscles cardiaques, les reins et le foie et surtout en forte concentration dans les  
216 muscles squelettiques (5, 6, 78). En outre, il y a plus de carnosine que d'ansérine dans les  
217 protéines de mammifères que dans celles de volaille. L'identification des PAT jusqu'au  
218 niveau de l'espèce pourrait également être possible sur la base du ratio  
219 carnosine/ansérine/balénine (81).

220

221 **4.2. Les méthodes de biologie moléculaire**

222 4.2.1. Les méthodes immunologiques

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

227 Une technique employant des microsphères couplées à des Ac et un cytomètre de flux (*flow*  
228 *microbead immunoassay*) a été mise au point (37). Cette technique permet de détecter des

229 déterminants de PrP dans des extraits de FVO avec une grande spécificité et permet également de  
230 détecter la PrP<sup>sc</sup> dans des FVO bovines contaminées par un cerveau infecté de tremblante à un ratio de  
231 poids égal à 50 :1 (65). Bien que ce genre de détection reste marginal, les méthodes immunologiques  
232 permettent néanmoins de détecter si le TTL a bien été appliqué aux farines animales.

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

244 Un test spécifique détectant des protéines de ruminants dans l'alimentation animale a été développé  
245 (*Reveal® for ruminant in feed*). Ce test est très spécifique et, selon la notice du fabricant (Neogen  
246 Corporation, Lansing, MI), nécessite 20 minutes pour obtenir un résultat. Un second test de la même  
247 firme appelé *Agri-screen Ruminant MBM*, détecte la présence de FVO de ruminants dans des FVO  
248 pour non ruminants. Le seuil de détection du premier test se situe à 1% de protéines de ruminants dans  
249 les matières premières (51). Le second test est annoncé avec un seuil de détection de 5% de FVO,  
250 raison pour laquelle il ne sera pas pris en compte. Un troisième test existe, le Feedcheck® vendu  
251 comme un test spécifique de détection des protéines d'animaux terrestres (mammifères et oiseaux)  
252 (Strategics Diagnostics Inc.) (**Tableaux III et IV**).

253 Les méthodes (semi-)quantitatives reposent sur l'utilisation de tests immuno-enzymatiques (*Enzyme-*  
254 *Linked ImmunoSorbent Assay*, ELISA), subdivisés en ELISA indirects, ELISA de compétition et  
255 ELISA sandwich. Ces méthodes détectent des protéines spécifiques à des seuils très bas (ng/ml) et en  
256 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

285 détection est à replacer dans le cadre du respect de la législation communautaire et, en particulier, le  
286 respect de l'interdiction de toute forme de cannibalisme. Aucune réaction croisée n'a été mise en  
287 évidence entre la détection de protéine musculaire squelettique de porc et le sang, le lait ou la gélatine  
288 (18). Les Ac sélectionnés doivent être capables de reconnaître des épitopes de la TnI traitée ou non par  
289 un TTL, c'est-à-dire de la TnI présente autant dans les matières premières que dans les muscles ayant  
290 subi un TTL (21). A l'instar de la PCR, l'avantage principal de ces protéines détectées par les tests  
291 ELISA est qu'elles ne sont pas présentes dans toutes les cellules de l'espèce ciblée. Par exemple, la h-  
292 caldesmon est absente du muscle cardiaque et des muscles squelettiques alors qu'elle est présente dans  
293 les muscles lisses (48).

294

#### 295           4.2.2. La technique PCR

296 L'amplification en chaîne par polymérase ou plus communément notée PCR pour *Polymerase Chain*  
297 *Reaction* est une technique de réPLICATION ciblée *in vitro* permettant d'obtenir à partir d'un échantillon  
298 complexe et peu abondant, d'importantes quantités d'un fragment d'ADN spécifique et de longueur  
299 définie. Des millions de copies peuvent ainsi être produits en quelques heures grâce à une succession  
300 de réactions de réPLICATION d'une matrice double brin d'ADN. Deux amorces oligonucléotidiques dont  
301 les extrémités 3-prime pointent l'une vers l'autre sont utilisées pour chaque réACTION et elles délimitent  
302 alors le fragment d'ADN à amplifier (amplicon). Au lieu de n'utiliser que la matrice originelle comme  
303 base, tous les produits obtenus sont utilisés comme matrice pour la réACTION suivante. L'amplification  
304 obtenue est alors exponentielle au lieu d'être linéaire et peut être couplée à un signal lumineux  
305 permettant la déTECTION et la quantification des copies d'amplicon. La Taq polymérase est une  
306 polymérase résistante aux températures élevées et elle permet ainsi une automatisation de la technique  
307 (14, 54).

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

312 La PCR en temps réel (*Real time PCR*), notée également Q-PCR lorsqu'elle est quantitative, consiste à  
313 mesurer la quantité d'ADN polymérisé à chaque cycle grâce à un marqueur fluorescent (11, 38). Son  
314 principe permet de faire des mesures quantitatives des copies de l'amplicon mais elle nécessite des  
315 thermocycleurs particuliers. La Q-PCR est une technique prise en considération pour la quantification  
316 des traces de farines animales. L'utilisation de sondes d'hybridation pour la Q-PCR est systématique.  
317 Une mesure de fluorescence est obtenue et permet de donner une valeur numérique (Ct) définissant le  
318 nombre de cycles nécessaires pour atteindre un niveau défini de fluorescence relative permettant la  
319 détection du signal. Ce Ct renseigne sur le processus d'amplification permettant la comparaison de  
320 différents échantillons afin d'établir les résultats définitifs. La Q-PCR utilise des amplicons de petite  
321 taille, présents souvent en grande quantité dans les PAT traitées à haute température (43).  
322 La PCR multiplexe est un protocole destiné à amplifier plus d'un amplicon à la fois, généralement en  
323 ajoutant un couple d'amorces spécifiques. La PCR multiplexe peut se faire en temps réel avec une  
324 sonde spécifique couplée à un fluorophore (24). Toutefois, son aspect quantitatif ne fait pas  
325 l'unanimité.  
326 Après amplification d'une région définie, la RFLP-PCR (technique de polymorphisme de longueur des  
327 fragments de restriction, RFLP) permet d'obtenir des marqueurs (24). En faisant agir plusieurs  
328 enzymes de restriction, l'étude du polymorphisme se situe à autant de sites particuliers qui se répètent  
329 tout au long de la molécule d'ADN à partir des produits PCR et évite l'étape d'hybridation et  
330 l'utilisation de sonde radioactive. Le produit PCR digéré par une ou plusieurs enzymes de restriction  
331 est simplement mis à migrer dans un gel d'agarose et le polymorphisme de la position et du nombre de  
332 bandes est visualisé par une réaction colorée (bromure d'éthydium).  
333 Différentes PCR ont été mises au point. Elles utilisent des protocoles d'extraction et des cibles  
334 différentes ce qui rend complexe leur comparaison.

335 **4.3. Les méthodes spectroscopiques**

336 Il existe d'autres techniques comme les méthodes spectroscopiques permettant d'analyser des  
337 échantillons en fonction du spectre que l'ensemble des molécules constitutives donnent. Elles sont non  
338 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.

344

#### 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.

355

## 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

393 protéines h-caldesmon. Le principe basé sur la détection des TnI reste toutefois intéressant à  
394 développer dans des conditions de TTL conformes aux normes européennes. La matrice du  
395 prélèvement doit aussi être prise en compte. L'utilisation de différentes concentrations en graisses de  
396 viande de porc et viande de bœuf a montré que le signal de détection obtenu pour la détection de TnI  
397 par un test ELISA sandwich ne différait pas de manière significative. Une technique de préparation de  
398 l'échantillon avant de pratiquer un test ELISA permet d'extraire des quantités similaires de TnI quel  
399 que soit le pourcentage de graisses présent dans la matrice (79). Les principaux inconvénients des  
400 techniques immunologiques de type ELISA sandwich sont l'interférence avec les matrices  
401 alimentaires comme le lait. Par ailleurs, un aliment composé pourrait renfermer de très faible  
402 concentration de FVO ou de farines de poisson (40). Ces techniques immunologiques peuvent servir à  
403 affiner la source des FVO (tissu-mère) en troisième intention mais ne semblent pas efficaces comme  
404 premier test de dépistage.

405 L'amélioration de la Se peut passer par l'utilisation des méthodes PCR en jouant sur la taille de  
406 l'amplicon sélectionné. Selon les études scientifiques réalisées, sa taille peut varier de 68 à 359 paires  
407 de bases (bp). Celle-ci peut influencer proportionnellement le signal du test PCR. Le nombre de cycles  
408 nécessaires passe, par exemple, de 16 cycles pour une sonde de 68 bp à 39 cycles pour une de 174 bp  
409 (38). Des sondes d'une longueur supérieure à 174 bp ne donnent plus de signal mais elles servent  
410 surtout à détecter les viandes fraîches, cuites ou en conserves et non à détecter des FVO ayant subi un  
411 TTL (10, 13, 23, 38, 50, 52, 53, 84, 113). Ces résultats sont en accord avec d'autres études (36)  
412 démontrant que les amplicons de 147 bp peuvent être utilisés pour détecter la présence d'ADN  
413 mitochondrial bovin dans des échantillons de FVO traitées selon la législation européenne en vigueur.  
414 Le nombre élevé de FN et FP trouvés dans une étude comparative (40) s'explique respectivement par  
415 la grande taille de la sonde (271 bp) et par la présence possible d'une source autorisée d'ADN bovin  
416 (lait, sang), autre que les FVO ajoutées à l'alimentation animale. Une étude récente montre que  
417 l'utilisation de sondes d'environ 100 bp et d'une Q-PCR sont deux pré-requis indispensables pour  
418 obtenir une augmentation de la Se (76). La Se de la PCR peut également être améliorée en faisant  
419 varier le nombre de cycles nécessaires pour la détection. Des résultats obtenus concernant le Ct pour  
420 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

448 menées en 2007 par l'EURL-AP afin de juger de la valeur qualitative (107) et quantitative (106) de la  
449 détection de la MO par les LNR.

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

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

470

471 Un laboratoire doit également pouvoir effectuer un maximum d'analyses en un minimum de temps  
472 avec une objectivité à toute épreuve afin de répondre aux exigences induites par le cadre législatif. Les  
473 techniques immunologiques de type ELISA sandwich pourraient, à terme, si leur sensibilité s'améliore  
474 davantage se prêter à l'analyse d'un grand nombre d'échantillons par automatisation, réduisant ainsi  
475 le temps d'analyse. Elles sont rapides et de faibles coûts; elles permettent un dépistage efficace. Pour

476 la PCR par contre, l'automatisation n'est pas encore possible. Pour la microscopie, l'objectivité de la  
477 lecture peut être améliorée en utilisant des techniques de microscopie NIR. Ainsi, par exemple, les  
478 résultats obtenus avec la technique NIRM sont équivalents à ceux obtenus en MO avec les avantages  
479 supplémentaires de l'objectivité et de la possibilité d'automation. La caméra NIR, une autre technique  
480 de microscopie proche infrarouge, permet une acquisition beaucoup plus rapide des spectres de  
481 particules et augmente fortement le nombre d'échantillons analysés par unité de temps par rapport à la  
482 méthode NIRM. La diminution des coûts salariaux et l'augmentation du nombre d'échantillons  
483 analysés se traduisent par une rentabilité accrue de la caméra NIR, malgré son coût initial  
484 d'investissement important. Cette technique pourrait être utilisée dans les usines de production, afin  
485 d'agir plus en amont et de retirer les lots de matières premières contaminées. Ceux-ci seraient alors  
486 détruits ou réorientés, comme par exemple les matières premières contaminées par des farines de  
487 poisson qui seraient réorientées vers l'alimentation pour non ruminants ou ruminants non sevrés (102).  
488 Des désavantages pour cette technique existent néanmoins. La méthode caméra NIR actuelle ne peut  
489 analyser qu'un champ d'une épaisseur égale à une particule. Passer à la détection d'une tonne  
490 d'aliments prendrait beaucoup trop de temps. Un échantillonnage représentatif de l'aliment à analyser  
491 serait donc obligatoire. La difficulté résiderait également dans l'analyse des spectres obtenus. Avec la  
492 NIRM, le spectre de chaque type d'aliments existe (matières premières, aliments composés,  
493 prémelanges). Lors de l'analyse par microscopie NIR, le spectre est enregistré et conservé dans une  
494 base de données.

495

496 L'étape 2 est de déterminer si le TTL a bien été effectué selon les normes en vigueur au sein de  
497 l'Union européenne. Ce TTL entraîne l'hydrolyse des protéines (45, 64) et la chaleur sèche détruit les  
498 épitopes (à 147°C pour du matériel d'origine ovine, à 152°C pour du matériel d'origine porcine, et à  
499 plus de 160°C pour du matériel d'origine bovine (4)). L'emploi de techniques immunologiques en  
500 début de détection est à même de vérifier cela. Les Ac utilisés pour ce genre de test sont dirigés contre  
501 des protéines stables à haute température (109). La méthode ELISA est une méthode fiable pour la  
502 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 pourraient 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 (tARNlys/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

530 faut que la composition, le conditionnement et les traitements des produits soient parfaitement définis  
531 mais ce n'est pas le cas dans l'alimentation animale.

532 Quand le diagnostic de positivité de l'échantillon est posé et que l'espèce et le tissu de provenance  
533 sont établis avec certitude, il reste à retrouver le produit originel pour retrouver les autres  
534 contaminations possibles. Dans ce contexte, la description des échantillons (composition précise) et les  
535 informations concernant la traçabilité et/ou la préparation des échantillons s'avèrent primordiales (14,  
536 23, 52).

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

539 Pour les techniques spectrophotométriques, la détection en continu sur tapis roulant d'un échantillon  
540 représentatif du lot de matières premières et/ou des aliments composés par spectrophotométrie pourrait  
541 être une solution, permettant d'éliminer les lots d'aliments contaminés par des protéines animales et  
542 ainsi de diminuer le coût de revient des analyses. Un lot correspond à une formule particulière  
543 produite par un fabricant sur une période de 24h. Sa taille n'est donc pas définie (59). Ce premier filtre  
544 serait suivi d'un second portant l'analyse sur un mélange d'échantillons plutôt que l'analyse  
545 individuelle de ceux-ci. Cela permettrait de diminuer le volume à échantillonner. Ensuite, seuls les lots  
546 positifs seraient confirmés avec des techniques plus spécifiques comme les tests immunologiques et/ou  
547 la PCR, afin de déterminer plus précisément si des PAT sont présentes et de déterminer l'espèce et le  
548 tissu d'origine.

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

555 La technique de détection optimale des PAT doit pouvoir répondre à différentes questions : les  
556 protéines retrouvées dans l'alimentation du bétail sont-elles des protéines d'origine animale  
557 prohibées ? Si oui, en quelle quantité ? Un schéma événementiel est proposé à la **Figure 2**. Il est

558 ensuite nécessaire de vérifier également si le TTL et le marquage au GTH obligatoire des matières  
559 premières ont bien été effectués conformément à la législation européenne en vigueur. Le GTH est  
560 détectable en utilisant la technique du spectromètre de masse couplé à une chromatographie gazeuse.  
561 Il reste à mentionner dans la législation européenne qu'une tolérance existe dans certaines conditions  
562 énumérées dans l'annexe IV du règlement européen 999/2001/CE (94). Elle concerne les PAT  
563 retrouvées dans l'alimentation des animaux d'élevage. Elle stipule que l'utilisation des tubercules et  
564 des racines comestibles contenant ces produits, après détection de spicules osseux, peut être autorisée  
565 par les États membres, sous réserve qu'une analyse de risque soit favorable. L'analyse de risque doit  
566 tenir compte, au minimum, de l'ampleur de la contamination et de sa source éventuelle, ainsi que de la  
567 destination finale du lot.

568

## 569 **6. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**

570 L'intérêt du contrôle des traces de farines animales réside dans la détection des fragments d'os réalisée  
571 par la MO mais également d'autres fragments comme les plumes, écailles ou fibres musculaires. La  
572 détection peut aussi cibler les PAT grâce aux techniques immunologiques (détection des protéines  
573 comme Ag) ou des techniques PCR ciblant des fragments d'ADN. La détection des traces doit aboutir  
574 à une VPN proche de 100%. Il n'est pas opportun de laisser passer un FN d'où le souci primordial  
575 d'obtenir une Se la plus élevée possible. La MO garde évidemment sa place mais des améliorations  
576 peuvent être faites pour en améliorer la Se. La caméra NIR est d'exécution rapide et offre l'avantage  
577 de pouvoir traiter un grand nombre d'échantillons par unité de temps. Elle pourrait permettre de passer  
578 en revue toute les matières premières afin d'isoler et de retirer de la chaîne de fabrication des lots  
579 susceptibles d'être contaminés. Les techniques immunologiques sont potentiellement intéressantes  
580 pour vérifier l'application du TTL et déterminer le tissu de provenance et d'origine de celui-ci. La  
581 détection des TnI semble prometteuse mais des améliorations en termes de Sp sont encore nécessaires.  
582 Les tests sur tigette sont rapides, à portée de tous et bon marché, mais ont un seuil de détection non  
583 adapté aux exigences européennes. La PCR permettrait alors, avec sa Sp très élevée de confirmer et

584 préciser l'espèce d'origine, alors que le tissu d'origine (prohibé ou non) pourrait être déterminé  
585 antérieurement par un test ELISA.

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

588 Allier les performances de la caméra NIR et l'ELISA qui autorisent une détection et une appartenance  
589 ou non au matériel prohibé, à la Q-PCR qui autorise la confirmation d'espèce, permettrait d'aboutir à  
590 un meilleur outil de détection. Des techniques olfactométriques sont également en développement  
591 (17). Par ailleurs, renforcer la législation et le contrôle concernant la traçabilité des aliments doit être  
592 poursuivi pour prévenir l'occurrence d'EST en évitant tout risque de fraude. La législation s'oriente  
593 vers un étiquetage semi ouvert, c'est-à-dire avec mention de tous les ingrédients constituant l'aliment  
594 mais sans mention des teneurs. Celles-ci seront connues via les formules de composition des aliments  
595 indiquées sur l'étiquetage. La détection des PAT doit se dérouler dans une Europe harmonisée.

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

600 Une corrélation entre l'âge à la détection des cas d'ESB et le niveau de contamination de  
601 l'alimentation a été documentée (115). Des doses très faibles de prions pathogènes (1mg au lieu d'1g)  
602 peuvent être infectantes et occasionner l'ESB. En outre, la transmission de l'ESB par de faibles  
603 quantités de PAT, même en dessous de 0,1% dans l'alimentation des bovins ne peut pas être exclue  
604 (29).

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

609 La problématique restera une problématique de détection de traces de PAT. Seules les bonnes  
610 pratiques peuvent les diminuer. Une forte diminution du nombre de cas d'ESB enregistrés a été  
611 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

615 **7. BIBLIOGRAPHIE**

- 616 1. Agence Fédérale de la Sécurité de la Chaîne Alimentaire (AFSCA) (2008).- Circulaire du 24 avril  
617 2008 relative à l'élimination des matériels à risque spécifiés (MRS), notamment en fonction des  
618 modifications apportées en dernier lieu par le Règlement (CE) no 357/2008 de la Commission du 22  
619 avril 2008 modifiant le règlement (CE) no 999/2001 du Parlement européen et du Conseil fixant les  
620 règles pour la prévention, le contrôle et l'éradication de certaines encéphalopathies spongiformes  
621 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).
- 623 2. Andrews C., Berger R., Magneau R., Schwab B. & Johnston R. (1992) - Detection of beef, sheep,  
624 deer, and horse meat in cooked meat products by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. AOAC Int*,  
625 **75**, 572-576.
- 626 3. Ansfield M., Reaney S. & Jackman R. (2000a). - Production of a sensitive immunoassay for  
627 detection of ruminant and porcine proteins, heated to  $> 130^{\circ}\text{C}$  at 2,7 bar, in compound animal  
628 feedstuffs. *Food Agric. Immunol* , **12**, 273-284.
- 629 4. Ansfield M., Reaney S. & Jackman R. (2000b). - Performance assessment and validation of a  
630 sensitive immunoassay for detection of ruminant and porcine heat stable proteins in compound animal  
631 feedstuffs. *Food Agric. Immunol* , **12**, 285-297.
- 632 5. Aristoy M.C. & Toldra F. (2004a). - A simple, fast and reliable methodology for the analysis of  
633 histidine dipeptides as markers of the presence of animal origin proteins in feeds for ruminants. *Food  
634 Chem.*, **84**, 485-491.
- 635 6. Aristoy M.C. & Toldra F. (2004b). - Histidine dipeptides HPLC-based test for the detection of  
636 mammalian origin proteins in feed for ruminants. *Meat Sci.*, **67**, 211-217.
- 637 7. Baeten V., von Holst C., Garrido A., Vancutsem J., Michotte Renier A. & Dardenne P. (2005a). -  
638 Detection of banned meat and bone meal in feedstuffs by near-infrared microscopic analysis of the  
639 dense sediment fraction. *Anal Bioanal. Chem* , **382**, 149-157.
- 640 8. Baeten V., von Holst C., Fissiaux I., Michotte Renier A., Murray I. & Dardenne P. (2005b). - The  
641 near infrared microscopic (NIRM) method: a combination of the advantages of optical microscopy and  
642 near-infrared spectroscopy (WP5). In Strategies and methods to detect and quantify mammalian  
643 tissues in feedingstuffs., (Office for Official Publications of the European Communities),  
644 Luxembourg,

- 645 http://bookshop.europa.eu/eubookshop/FileCache/PUBPDF/KINA21124ENC/KINA21124ENC\_002.  
646 pdf)
- 647 9. Bellagamba F., Moretti V. M., Commincini 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., Commincini S., Ferretti L., Valfre F. & Moretti V. (2006). - Application of  
653 quantitative real-time PCR in the detection of prio-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., Dalmasso I., Nucera D., Turi R., Rosati S., Squadrone S., Goria 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™ 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. *JAOAC 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.

- 705 31. European Food Safety Agency. (2007b). - Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards  
706 on certain aspects related to the risk of Transmissible Spongiform Encephalopathies (TSEs) in ovine  
707 and caprine animals. *The EFSA Journal*, **466**, 1-10.
- 708 32. European Food Safety Agency. (2007c). - Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards  
709 on Certain Aspects related to the Feeding of Processed Animal Proteins to Farm Animals. *The EFSA*  
710 *Journal*, **576**, 1-41.
- 711 33. European Food Safety Agency. (2008). - Scientific and technical clarification in the interpretation  
712 and consideration of some facets of the conclusions of its Opinion of 8 March 2007 on certain aspects  
713 related to the risk of Transmissible Spongiform Encephalopathies (TSEs) in ovine and caprine animals  
714 *The EFSA Journal*, **626**, 1-11.
- 715 34. Eurostat. Cheptels bovins (données annuelles). (2008). - Adresse URL :  
716 [http://epp.eurostat.ec.europa.eu/extraction/retrieve/fr/theme5apro/apro\\_mt\\_lscatl?OutputDir=EJOutpu](http://epp.eurostat.ec.europa.eu/extraction/retrieve/fr/theme5apro/apro_mt_lscatl?OutputDir=EJOutpu)  
717 [tDir\\_571&user=unknown&clientsessionid=EE6B6F6D0EC205174433F2A85726D786.extraction-](tDir_571&user=unknown&clientsessionid=EE6B6F6D0EC205174433F2A85726D786.extraction-)  
718 <worker->  
719 [1&OutputFile=apro\\_mt\\_lscatl.htm&OutputMode=U&NumberOfCells=13&Language=fr&OutputMi](1&OutputFile=apro_mt_lscatl.htm&OutputMode=U&NumberOfCells=13&Language=fr&OutputMi)  
720 <me=text%2Fhtml&> (consulté le 05 août 2008).
- 721 35. Fernandez Pierna J., Baeten V., Renier A.M., Cogdill R. & Dardenne P. (2004). - Combination of  
722 support vector machines (SVM) and near-infrared (NIR) imaging spectroscopy for the detection of  
723 meat and bone meal (MBM) in compound feeds. *Journal of Chemometrics*, **18** (7-8), 341-349.  
724
- 725 36. Frezza D., Favaro M., Vaccari G., von Holst C., Giambra V., Anklam E., Bove D., Battaglia P.,  
726 Agrimi U., Brambilla G., Ajmone-Marsan P. & Tartaglia M. (2003). - A competitive polymerase chain  
727 reaction-based approach for the identification and semi-quantification of mitochondrial DNA in  
728 differently heat-treated bovine meat and bone meal. *J. Food Prot.*, **66**, 103-109.
- 729 37. Fulwyler M. & Mc Hugh T. (1990). - Flow microsphere immunoassay for the quantitative and  
730 simultaneous detection of multiple soluble analytes. *Methods Cell. Biol.*, **33**, 613-629.
- 731 38. Fumière O., Dubois M., Baeten V., von Holst C. & Berben G. (2006). - Effective PCR detection of  
732 animal species in highly processed animal by-products and compound feeds. *Anal Bioanal Chem.*,  
733 **385**, 1045-1054.
- 734 39. Gizzi G., van Raamsdonk L., Baeten V., Murray I., Berben G., Brambilla G. & von Holst C.  
735 (2003). - An overview of tests for animal tissues in feeds applied in response to public health concerns  
736 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-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 meatand 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.pdf](http://bookshop.europa.eu/eubookshop/FileCache/PUBPDF/KINA21124ENC/KINA21124ENC_002.pdf)).  
811
- 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 contaminates 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 thyréostatique. *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 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'execution conférées a 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

## 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
<b>ADNc :</b>	Acide DesoxyriboNucléique complémentaire	Transformées
<b>AFSCA :</b>	Agence Fédérale pour la Sécurité de la Chaine Alimentaire	<b>PCR :</b> Réaction de polymérisation en chaîne ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
<b>Ag :</b>	Antigène	<b>PrP :</b> Protéine Prion
<b>ARN :</b>	Acide RiboNucléique	<b>PrPres :</b> Protéine prion résistante à la proteinase K
<b>EURL-AP :</b>	Laboratoire de Référence Communautaire pour les protéines animales	<b>PrPsc :</b> Isoforme anormale de la protéine prion
<b>CRA-W :</b>	Centre de Recherche Agronomique Wallon	<b>PrPres :</b> Protéine Prion résistante à la protéinase K
<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>Q-PCR :</b> PCR Quantitative
<b>Dir :</b>	Directive européenne	<b>RFLP-PCR :</b> <i>Restriction Fragment Length Polymorphism PCR</i>
<b>ELISA :</b>	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>	<b>rtPCR :</b> PCR en temps réel
<b>ESB :</b>	Encéphalopathie Spongiforme Bovine	<b>Se:</b> Sensibilité
<b>EST :</b>	Encéphalopathie Spongiforme Transmissible	<b>Sp:</b> Spécificité
<b>Fc :</b>	Fragment d'Anticorps correspondant à la fraction constante	<b>SNC :</b> Système Nerveux Central
<b>FN :</b>	résultat Faux Négatif	<b>TnI :</b> Troponine I
<b>FP :</b>	résultat Faux Positif	<b>TTL :</b> Traitement Thermique
<b>FVO :</b>	Farine de viandes et d'os	<b>Légal :</b> Légal
<b>GTH :</b>	TriHeptanoate de Glycerol	<b>vMCJ :</b> Nouveau variant de la Maladie de Creutzfeld-Jakob
<b>HPLC :</b>	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>	<b>VN :</b> résultat Vrai Négatif
<b>IR :</b>	Infra-Rouge	<b>VP :</b> résultat Vrai Positif
<b>LNR :</b>	Laboratoire National de Référence	<b>VPN :</b> Valeur Prédictive Négative
<b>LOD :</b>	Limite de Détection	<b>VPP :</b> Valeur Prédictive Positive
<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	

1

## TABLEAUX

2

### **I. TABLEAUX**

4

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

6

7   Légende :

8   ☒ : interdit

9   ☑ : autorisé

10

11

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

14

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

15

16

17

18 **Tableau III.** Différences entre le FeedChek® et le Reveal® concernant la détection de protéines  
 19 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 Nombre de lignes de résultat	1 1 2	
Réaction colorimétrique facilement interprétable	Non	Non	
Précision de détection	à 0,025% BMBM à 0,05% BMBM à 0,1% BMBM à 0,25% BMBM à 0,5% BMBM à 1% BMBM à 2% BMBM à 1% LM à 2% LM à 1% RMBM à 2% RMBM	Non atteint Non atteint Non atteint Non atteint Non atteint Non atteint Non atteint Non atteint Non atteint Non atteint	Non atteint Non atteint Atteint
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	

20

21 Légende :

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

23 LM : *lamb meal*; farines de moutons

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

25

26

27

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

Test	Résultats des lignes			Interprétations
	Contrôle	Test 1	Test 2	
	(a)	(b)	(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

30  
31

32      Légende :

33      (a) Ligne de contrôle : Elle permet de valider la bonne fonctionnalité du test. Elle apparaît quand le  
 34      phénomène de migration (Ag recherchés) a bien fonctionné.

35      (b) Ligne de test 1 : Elle apparaît lorsque l'antigène recherché est présent dans l'échantillon analysé.

36      (c) Ligne de test 2 : Elle apparaît lorsque l'antigène recherché est présent dans l'échantillon analysé.

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

38      FVO : farines de viandes et d'os

39      PM : protéines de mammifères

40      PA : protéines animales

41

42

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	Équin	Poulet	Dinde	Canard	Oie	
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, 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 : anserine 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
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.

68    **II. FIGURES**

69

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

71

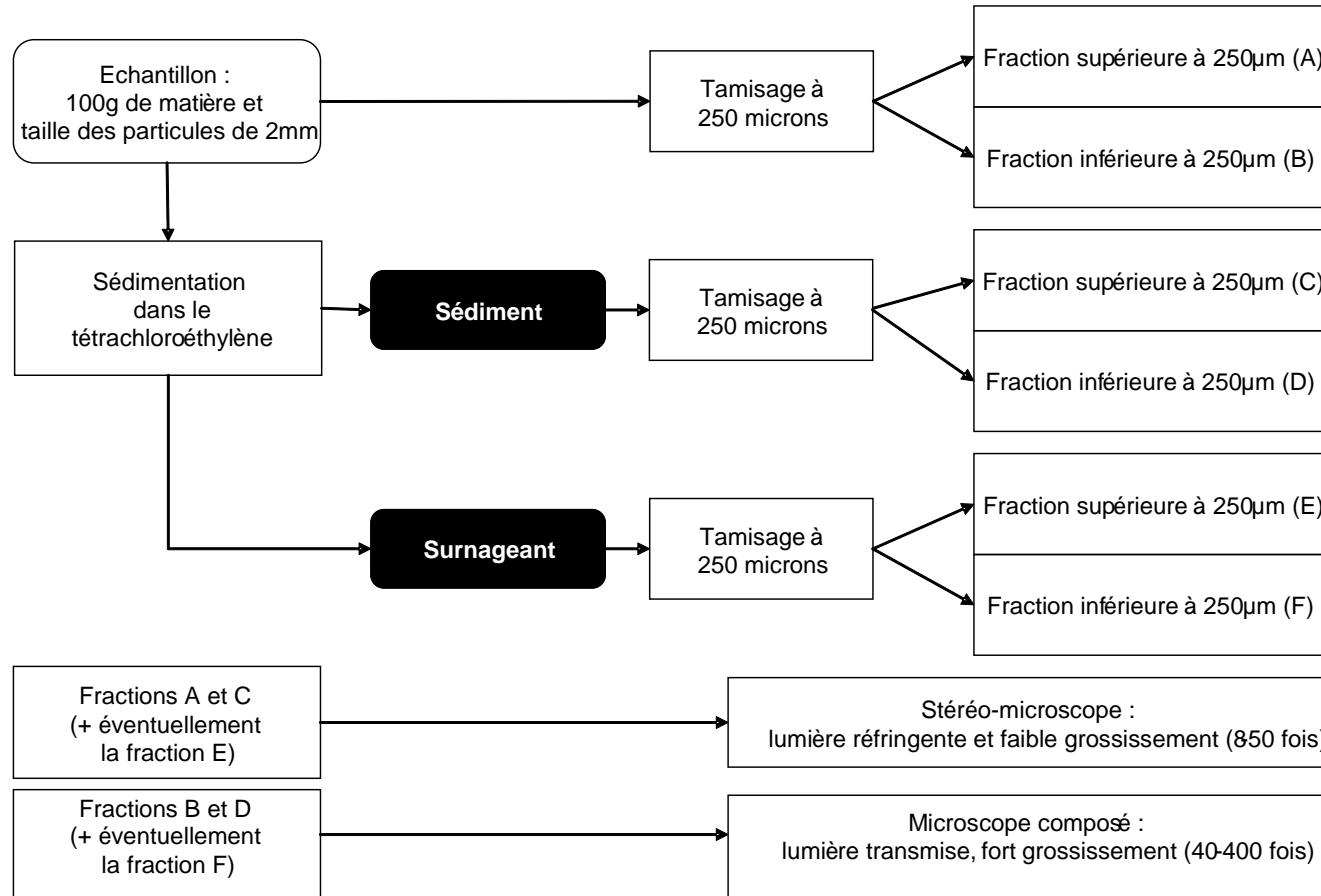
72    **Figure 2.** Schéma de testage envisageable pour améliorer la détection des farines animales dans  
73    l'alimentation du bétail

74

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

77    \*\* interdiction de nourrir les poissons d'élevage avec des PAT de poissons d'élevage, mais autorisation  
78    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

