

## *Résumé opérationnel*

## Résumé opérationnel

Les produits certifiés de qualité spécifique se situent au-delà des normes réglementaires minimales d'hygiène et de composition. Ils visent à rencontrer la demande des consommateurs ébranlés par les problèmes de sécurité alimentaire. Ces productions de qualité conçues dans le respect de l'environnement (liaison des productions au sol) et du bien-être animal requièrent des garanties précises pour être crédibles et viables. Pour cela, il est indispensable d'établir des systèmes de contrôle de leur conformité aux normes spécifiques ainsi que de leur étiquetage. Des méthodes d'analyse efficaces doivent impérativement faire partie des procédures de contrôle.

Nos recherches se focalisent dans le domaine du " poulet de chair " qui se caractérise par une multitude de labels et mentions en Belgique et en Europe : labels de qualité (Label de Qualité Wallon, Label Rouge en France, étiquetages particuliers prévus dans le cadre du règlement 91/1538/CEE), règlements européens relatifs aux Appellations d'Origine (Appellations d'Origine Protégées et Indications Géographiques Protégées - règlements 92/2081/CEE et 93/2037/CEE), Agriculture Biologique (règlement 1999/1804/CEE, législations nationales, normes privées).

Le DÉPARTEMENT QUALITÉ DES PRODUCTIONS AGRICOLES du CENTRE DE RECHERCHES AGRONOMIQUES DE GEMBLOUX s'est associé à l'UNITÉ DE ZOOTECHNIE de la FACULTÉ UNIVERSITAIRE DES SCIENCES AGRONOMIQUES DE GEMBLOUX pour la mise au point de méthodes permettant d'authentifier les viandes et produits carnés par l'utilisation de techniques d'analyse rapide (spectrométrie dans le proche infrarouge - SPIR) ou de techniques de biologie moléculaire. Le contrôle de la conformité des aliments pour volailles (absence de farines animales et d'antibiotiques) par SPIR en association avec d'autres méthodes analytiques (HPLC) a également été étudié.

Lors ce projet, nous avons démontré le potentiel de la spectrométrie dans le proche infrarouge pour distinguer les poulets issus de souches à croissance lente des poulets issus de souches à croissance rapide. Nous avons développé des modèles de discrimination permettant de distinguer les deux types de viande sur base de leur spectre dans le proche infrarouge. Cette technique rapide, peu coûteuse et non destructive pourrait être utilisée pour authentifier la majorité (> 80 %) des individus. Les modèles développés envisagent aussi bien l'analyse des carcasses entières de poulets que les découpes (cuisses ou blancs). Une expérimentation animale a également été réalisée en collaboration avec l'UNITÉ DE ZOOTECHNIE du Professeur André Théwis (FACULTÉ UNIVERSITAIRE DES SCIENCES AGRONOMIQUES DE GEMBLOUX) afin d'évaluer l'influence de l'alimentation sur le spectre infrarouge de la viande. Sur base des résultats obtenus lors de cette expérience, il serait possible de détecter par la spectrométrie dans le proche infrarouge plus de 70 % des fraudes (poulets ne répondant pas aux cahiers des charges imposant l'utilisation de souches à croissance lente et une alimentation spécifique). **Même si les modèles actuels reposent sur des mesures effectuées sur une population conséquente (> 150 poulets), il est nécessaire d'encore étendre nos bases de données et de tester de nouveaux algorithmes (par exemple : l'analyse par réseaux neuronaux). L'optimisation des performances de la technique devrait permettre son utilisation en routine.**

Un des résultats auxquels le projet a abouti est de montrer que la PCR-RFLP bien que préconisée pour déceler des mélanges de viandes n'est absolument pas appropriée pour un tel usage. En effet, si le recours à des amorces universelles présente bien l'avantage théorique de ne pas nécessiter d'idées préconçues sur les éventuels constituants du mélange, il s'est avéré que cette technique engendre un biais évident dans la détection des

espèces du mélange. Ainsi, dans un mélange de viandes dinde/poulet qui est sans doute l'une des fraudes les plus plausibles, il est apparu qu'au moyen de la technique PCR-RFLP une teneur de 10% en dinde est indétectable. On ne commence à déceler sa présence qu'à partir de 25%. Cela s'explique par le fait que les amorces considérées comme universelles amplifient préférentiellement le poulet. Pour éviter ce phénomène de biais, le recours à des cibles univoques pour chaque espèce animale est préconisé. Les résultats obtenus jusqu'à présent en biologie moléculaire nous permettent de détecter des adultérations de viande de poulet par de la viande de dinde à des niveaux inférieurs au pourcent. **Cependant, la mise au point d'une stratégie ne nécessitant qu'une PCR unique pour la détection des différentes espèces animales présentes dans des préparations carnées reste néanmoins séduisante. L'utilisation de nouvelles techniques (par exemple : les biochips) et de sondes de capture spécifiques internes à des régions consensus devrait permettre de résoudre les problèmes de biais décrits plus haut.**

Grâce à la technique de l'AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism – Polymorphisme de Longueur de Fragments Amplifiés), nous avons pu identifier deux bandes permettant, sur la population que nous étudions, de distinguer les individus issus de souches à croissance lente et les poulets à croissance rapide. Ces déterminants moléculaires ont été isolés, clonés et séquencés : l'un est caractéristique des poulets à croissance lente (333 pb) et l'autre des poulets à croissance rapide (372 pb). Les marqueurs que nous avons identifiés sont apparemment corrélés à la vitesse de croissance. Ils pourraient toutefois aussi ne refléter qu'une liaison stable avec une race précise utilisée pour les souches soit à croissance lente, soit à croissance rapide. La signification exacte de ces déterminants nous échappe et cela d'autant plus qu'aucune homologie n'a été établie avec des séquences connues qui auraient pu être indicatrices d'un lien direct avec la croissance (comparaison avec les séquences actuellement répertoriées dans les banques internationales de séquences). Ce constat n'enlève rien à leur utilité actuelle (vérification par rapport à l'utilisation de la souche JA) mais pourrait limiter l'étendue de leur champ d'application (ex. valorisation limitée aux souches à croissance lente produite à partir d'une race particulière dans l'ascendance...).

Le choix de l'AFLP se justifiait par le fait qu'elle ne nécessite aucune connaissance préalable du génome tout en étant reproductible. Les résultats obtenus jusqu'à présent nous permettent d'envisager avec optimisme la distinction entre les souches de poulets à croissance lente et les souches de poulets à croissance rapide sur base de déterminants moléculaires. L'AFLP apparaît cependant comme une technique d'investigation. Elle nous semble trop lourde à mettre en œuvre pour des analyses de routine (le délai pour obtenir un résultat peut être estimé à deux jours). Il est clair que, sur base des séquences obtenues à partir des bandes isolées, **la mise au point et la validation sur un nombre étendu d'individus d'un test rapide utilisant la PCR (résultat obtenu dans la journée) est à envisager. Un test de ce type pourrait être utilisé en routine par un laboratoire de contrôle mais requiert, au préalable de bien cerner la portée exacte des déterminants mis en évidence. Ce test aurait, en outre, l'avantage d'être également applicable à des produits transformés (cuits par exemple) contrairement à l'AFLP qui requiert un ADN de bonne qualité.**

D'autre part, l'AFLP permet des combinaisons (couple d'enzymes de restriction, nucléotides sélectifs) pratiquement infinies. **La technique AFLP, bien maîtrisée par notre laboratoire, peut encore être utilisée pour la recherche de nouvelles bandes discriminantes entre souches de poulets à croissance rapide et souches à croissance lente. La caractérisation des souches à croissance lente les plus largement utilisées commercialement pourrait être envisagée dans ce cadre. Une valorisation commerciale des résultats de ces recherches (brevet, kits d'analyses) n'est pas utopique.**

**En ce qui concerne l'alimentation animale, la détermination de l'origine des particules au moyen de la microscopie dans le proche infrarouge apparaît être la voie la plus prometteuse pour détecter rapidement les protéines et les graisses d'origine animale incorporées dans les aliments.** L'utilisation de cette technique est développée au sein du DÉPARTEMENT QUALITÉ DES PRODUCTIONS AGRICOLES du CENTRE DE RECHERCHES AGRONOMIQUES DE GEMBOUX. Elle nécessite la constitution de bases de spectres prenant en compte toutes les matières premières entrant dans la composition des aliments destinés au bétail.

Actuellement, le contrôle de la présence de substances inhibitrices (antibiotiques ou autres) se fait dans les aliments par la mise en évidence d'un pouvoir inhibiteur vis-à-vis de différentes souches bactériennes. L'analyse de différentes matières premières a permis de mettre en évidence l'action inhibitrice de nombreux composants, notamment les différentes parties provenant de la mouture de céréales (son, rebulet, remoulage). D'autres matrices (farine de luzerne), après extraction aqueuse, laissent apparaître une zone d'inhibition. Des souches bactériennes ont été isolées à partir des échantillons de matières premières présentant un résultat positif. L'une d'entre elles, *Bacillus licheniformis*, active contre les souches tests, est responsable de la production d'une molécule utilisée en alimentation animale : la bacitracine. Des contrôles chromatographiques effectués, il ressort que cet antibiotique n'est en rien responsable des résultats positifs. Des résultats semblables ont été observés sur des échantillons de viandes de poulet présentant des résultats positifs anormaux : une souche de *Klebsiella oxytoca* a été isolée à partir de la viande, cette bactérie présentant, elle aussi une activité bactéricide vis-à-vis des souches tests utilisées.

Une méthode HPLC couplée à un détecteur à fluorescence a été développée pour la mise en évidence de coccidiostatiques dans les aliments (sulfamides). L'extraction développée et le paramétrage HPLC ont confirmé la pureté des pics obtenus.