



Ministère des Classes Moyennes  
et de l'Agriculture

Ministère des Classes Moyennes et de l'Agriculture  
Centre de Recherches Agronomiques de Gembloux  
Département Qualité des Productions Agricoles



# *Développement de systèmes analytiques pour le contrôle de l'authenticité de viandes certifiées*

*Contrat NP/42/022  
Rapport final*



Services du Premier Ministre  
Services fédéraux des Affaires scientifiques, techniques et culturelles  
Plan d'appui scientifique à une politique de développement durable  
Programme « Normes des produits alimentaires »



Ministère des Classes Moyennes et de l'Agriculture  
Centre de Recherches Agronomiques de Gembloux  
Département Qualité des Productions Agricoles



# *Développement de systèmes analytiques pour le contrôle de l'authenticité de viandes certifiées*

## *Contrat NP/42/022 Rapport final*

Coordinateur du projet :

Dr. ir. Pierre Dardenne,  
Chef du Département Qualité des Productions Agricoles

Collaborateurs :

ir. Olivier Fumière, Assistant  
ir. Jean-Michel Romnee, Assistant  
Dr. ir. Gilbert Berben, Chef de travaux



Services du Premier Ministre  
Services fédéraux des Affaires scientifiques, techniques et culturelles  
Plan d'appui scientifique à une politique de développement durable  
Programme « Normes des produits alimentaires »

## *Table des matières*

## Table des matières

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ABRÉVIATIONS

EXECUTIVE SUMMARY

RÉSUMÉ OPÉRATIONNEL

1. INTRODUCTION	1
1.1 Cadre général de la recherche	1
1.2 Objectifs de la recherche	2
2. DÉVELOPPEMENT DE MÉTHODES DE CONTRÔLE DES DÉCOUPES DE POULETS ET PRODUITS DE VIANDES DE POULETS DE PRODUCTIONS CERTIFIÉES	4
2.1 Introduction	4
2.1.1 La spectrométrie dans le proche infrarouge	4
2.1.2 La biologie moléculaire	4
2.1.3 L'électrophorèse capillaire	5
2.2 Echantillonnage de viandes fraîches de poulets et produits de viandes de productions certifiées	6
2.2.1 Inventaire et typologie des produits commercialisés dans le pays	6
2.2.1.1 Introduction	6
2.2.1.2. Catégories de poulet de chair	7
2.2.1.3. Caractéristiques organoleptiques d'une viande de poulet de qualité	12
2.2.1.4. Facteurs susceptibles d'influencer la qualité des poulets	12
2.2.2 Collecte des échantillons	15
2.3 Authentification de l'origine génétique des produits de viande	16
2.3.1 Mise au point d'une méthode d'extraction d'ADN	16
2.3.2 Essais d'amplification de segments du gène du cytochrome <i>b</i>	17
2.3.2.1 La technique PCR-RFLP appliquée au gène du cytochrome <i>b</i>	17
2.3.2.2 Constance de la présence de sites spécifiques au poulet dans les segments du gène du cytochrome <i>b</i>	17
2.3.2.3 Analyses de mélanges poulet-dinde	19
2.3.2.4 Identification de l'espèce animale par amplification de cibles univoques	20
2.3.3 Recherche de déterminants moléculaires permettant de caractériser des souches de poulet à croissance lente	21
2.3.3.1 Résultats obtenus au moyen de l'AFLP	21

2.3.3.2	Résultats obtenus au moyen de la PCR ancrée	33
2.3.3.3	Résultats obtenus au moyen de la PCR-RFLP	33
2.3.4	Perspectives concernant l'authentification génétique	34
2.4	Authentification des découpes de poulet visant à distinguer les poulets de qualité certifiée des poulets ordinaires grâce à la SPIR	35
2.4.1	Détermination du meilleur mode de présentation pour obtenir des spectres reproductibles et mesures des échantillons de viande	35
2.4.2	Caractérisation des spectres	37
2.4.3	Classement statistique des échantillons	39
2.4.4	Résultats et discussion	42
2.4.5	Conclusions sur les performances obtenues par la technique de la spectrométrie dans le proche infrarouge	45
2.4.6	Influence des interactions génotype x alimentation sur les spectres infrarouges de découpes de poulets standards et labels	45
2.4.7	Analyse de la matière grasse présente dans la viande de poulet	49
2.5	Potentialités de l'électrophorèse capillaire pour la caractérisation de l'origine de viandes sur base de leur profil en protéines	53
2.5.1	Mise au point du protocole d'extraction des protéines	53
2.5.1.1	Extraction aqueuse des protéines sarcoplasmiques	53
2.5.1.2	Extraction saline des protéines myofibrillaires	53
2.5.2	Préparation des échantillons à l'analyse par électrophorèse capillaire	53
2.5.3	Analyse des échantillons	54
2.5.4	Conclusions	55
3.	DÉVELOPPEMENT DE MÉTHODES DE CONTRÔLE DES NORMES D'ÉLEVAGE RELATIVES À L'ALIMENTATION DES POULETS DE PRODUCTIONS CERTIFIÉES	56
3.1	Introduction	56
3.2	Echantillonnage d'aliments pour poulets de productions certifiées	56
3.2.1	Inventaire et typologie des aliments certifiés commercialisés dans le pays	56
3.2.2	Collecte des échantillons	57
3.2.3	Authentification des formules d'aliments composés sur base de la SPIR	57
3.2.3.1	Constitution d'une gamme d'échantillons de référence	57
3.2.3.2	Authentification de farines pour bétail par microscopie dans le proche infrarouge	58
3.3	Contrôle de l'absence d'antibiotiques dans les aliments	70
3.3.1	Introduction	70
3.3.2	Identification des interférences de différents paramètres de l'alimentation lors de la mise en évidence de la présence d'antibiotiques	70

3.3.2.1 Détermination de l'action inhibitrice des aliments : méthode sur boîtes de Petri	70
3.3.2.2 Détermination de l'action inhibitrice des aliments : méthode par turbidimétrie	73
3.3.2.3 Détermination de l'action inhibitrice des aliments : méthode par diffusion en milieu liquide	74
3.3.2.4 Etude des échantillons dopés	81
3.3.2.5 Etude des échantillons positifs lors des tests microbiologiques	85
3.3.3 Mise au point de techniques analytiques (HPLC) destinées à la confirmation (identification et dosage) des inhibiteurs présent	92
3.3.3.1 Méthodes de détection des sulfamides	93
3.3.3.2 Préparation de l'aliment	94
3.3.3.3 Analyse et résultats	95
CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS	106
BIBLIOGRAPHIE	110

## ANNEXES

### Annexe n° 1 : Communications réalisées dans le cadre du projet

- Publications
- Interventions orales
- Posters

### Annexe n° 2 : Législations et normes existantes

- Législation européenne
  - ❖ RÈGLEMENT (CEE) N° 1906/90 DU CONSEIL du 26 juin 1990 établissant des normes de commercialisation pour les volailles et ses modifications
  - ❖ RÈGLEMENT (CEE) N° 1538/91 DE LA COMMISSION du 5 juin 1991 portant modalités d'application du règlement (CEE) n° 1906/90 du Conseil établissant des normes de commercialisation pour les volailles et ses modifications
- Législation de la Région Wallonne
  - ❖ Extrait de l'ARRETE DU GOUVERNEMENT WALLON du 29 septembre 1994 portant sur l'attribution de la dénomination " Label de Qualité wallon - Poulet de Chair "
- Comparaison des normes relatives au " Poulet de Chair - Label de Qualité Wallon " et au " Poulet de Chair - Biogarantie "(Agriculture biologique)

### Annexe n°3 : Liste des poulets utilisés dans le cadre de l'étude

### Annexe n° 4 : Protocoles techniques

- Extraction d'ADN génomique à partir de viande par la méthode au phénol-chloroforme et précipitation à l'éthanol
- Réalisation d'empreintes génétiques par la technique AFLP
- Clonage et séquençage des déterminants moléculaires spécifiques des souches à croissance lente /rapide mis en évidence par la technique AFLP
- Détermination de l'humidité - Matière sèche des viandes et produits à base de viande
- Détermination de la teneur en matière grasse totale - Matière grasse totale des viandes et produits à base de viande
- Détermination de la teneur en matière grasse libre - Matière grasse libre des viandes et produits à base de viande

Annexe n° 5 : Protocole de l'expérimentation animale étudiant l'influence des interactions génotype x alimentation sur les spectres infrarouge de découpes de poulets standards et labels

Annexe n° 6 : Résultats complets des analyses de matières grasses dans la viande de poulet

Annexe n° 7 : Localisation et séquence des fragments amplifiés par les kits Alcum

## *Liste des abréviations*



## Liste des abréviations

<b>µg</b>	Microgramme ( $10^{-6}$ gramme)
<b>AB</b>	Agriculture Biologique
<b>ACP</b>	Analyses en Composantes Principales
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>AERW</b>	Arrêté de l'Exécutif Régional Wallon
<b>AFD</b>	Analyse factorielle discriminante
<b>AFLP</b>	Amplified Length Fragment Polymorphism Polymorphisme de longueur de fragments amplifiés
<b>ANN</b>	Artificial Neural Network - Analyses en Réseaux Neuronaux
<b>ARN</b>	Acide Ribonucléique
<b>pb ou bp</b>	Paire de bases
<b>C.V.</b>	Cross-validation (nombre de groupes de cross-validation)
<b>CdC</b>	Cahier des Charges
<b>CQP</b>	Produit Certifié de Qualité Particulière
<b>CRA</b>	Centre de Recherches Agronomiques
<b>DAD</b>	Diode Array Detector - détecteur à diodes
<b>DET</b>	Detrending
<b>EC ou CE</b>	Electrophorèse capillaire
<b>FTIR ou</b>	Fourier Transformed Infra Red
<b>IRTF</b>	Spectrométrie Infrarouge à Transformée de Fourier
<b>GC-MS</b>	Gas Chromatography – Mass Spectroscopy Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
<b>HPCE</b>	High Pressure Capillary Electrophoresis Electrophorèse capillaire haute pression
<b>HPLC</b>	High Pressure Liquid Chromatography- Chromatographie Liquide Haute Pression
<b>ITAVI</b>	Institut Technique de l'Aviculture (France)
<b>LQW</b>	Label de Qualité Wallon
<b>Max.</b>	Maximum
<b>MB</b>	Moniteur Belge
<b>MBM</b>	Meat and Bone Meal Farine de viande et d'os
<b>mg</b>	Milligramme ( $10^{-3}$ gramme)
<b>MGT</b>	Matière Grasse totale
<b>min.</b>	Minimum
<b>MIR</b>	Middle Infra Red – Infrarouge Médian

*Liste des abréviations*

---

<b>MS</b>	Matière Sèche
<b>NIR</b>	Near Infrared – Infrarouge Proche
<b>nl</b>	Nanolitre ( $10^{-9}$ litre)
<b>nm</b>	Nanomètre ( $10^{-9}$ mètre)
<b>OPPEW</b>	Office de Promotion des Petits Elevages en Wallonie
<b>OC</b>	Organisme Certificateur
<b>PCA</b>	Plate Count Agar
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction - Réaction de polymérisation en chaîne
<b>PdC</b>	Poulet de Chair
<b>PLS</b>	Partial Least Square - Régression par les moindres carrés partiels
<b>PT</b>	Protéines totales
<b>R<sup>2</sup></b>	Coefficient de détermination
<b>RFLP</b>	Restriction Fragment Length Polymorphism Polymorphisme de longueur de fragment de restriction
<b>RW</b>	Région Wallonne
<b>SDS</b>	Sodium Dodécyl Sulfate
<b>SEC</b>	Standard Error of Calibration – Erreur Standard de Calibration
<b>SECV</b>	Standard Error of Cross-Validation - Erreur Standard de Validation Croisée
<b>SEP</b>	Standard Error of Prediction – Erreur Standard de Prédiction
<b>SNV</b>	Standard Normal Variate
<b>SNVD</b>	Standard Normal Variate and Detrend
<b>SPiR</b>	Spectrométrie dans le Proche Infrarouge
<b>UE</b>	Union Européenne
<b>WMSC</b>	Weighted Multiplicative Scatter Correction

## *Executive summary*

## **Executive summary**

Certified products of a specific quality aim to meet higher standards than the minimum statutory requirements regarding health and composition. They are intended as a response to demand from consumers concerned over food safety issues. Such quality products, designed to be compatible with the environment (linking of products to the soil) and animal welfare, require specific guarantees if they are to be credible and viable. To achieve this, systems have to be set up to verify their conformity with the specific standards and also their labelling. Reliable analytical methods are an essential part of the control procedures.

Our research is focused on the “broiler”, a product characterised by a variety of seals of approval and quality labels in Belgium and in Europe : quality labels (*Label de Qualité Wallon* - Walloon Quality Label, *Label Rouge* - Red Label in France, special labelling under regulation 91/1538/EEC), European regulations relating to labels of origin (*Appellations d’Origine Protégées*, protected indications of origin and *Indications Géographiques Protégées*, protected geographical indications (regulations 92/2081/EEC and 93/2037/EEC)), Organic Farming (regulation 1999/1804/EEC, national legislation and private standards).

The Department QUALITY OF AGRICULTURAL PRODUCTS at the GEMBLOUX AGRICULTURAL RESEARCH CENTRE has joined forces with the UNIT OF ANIMAL HUSBANDRY at GEMBLOUX AGRICULTURAL UNIVERSITY to develop methods for authenticating meats and meat products using rapid analysis techniques (near infrared spectroscopy-NIRS) or molecular biology techniques. Verifying the conformity of poultry feed (no animal meal or antibiotics) by NIRS in conjunction with other analytical methods (HPLC) has also been studied.

During the time of the research, it was demonstrated that near infrared spectroscopy is an appropriate technique to distinguish slow-growing chickens from fast-growing ones. Discriminant models based on the analyses of chicken meat by NIRS were developed. With this fast, cheap and non-destructive technique, NIRS-models are able to authenticate a majority (> 80 %) of the samples, be it either on carcasses or on cut pieces. An animal experiment was also set up with the collaboration of the UNIT OF ANIMAL HUSBANDRY (Professor André Théwis - GEMBLOUX AGRICULTURAL UNIVERSITY) to evaluate the relation between feed composition and NIR spectra of meat. According to the results, it would be possible to detect more than 70 % of fraud cases (chickens bred in contradiction with the set of production rules including the use of slow-growing chicken strains together with a specific feeding). **Even if discriminant models developed are based on the spectra acquired on a population with a significant number of specimens (more than 150 chickens), it would be better to extend the databases and to test new algorithms (e. g. neural network analysis). A good optimisation of the technique should allow its routine application.**

**One of the conclusions of the project is that PCR-RFLP is not appropriate for detecting the components of a meat mixture although it is reported as such.** The fact is that though the use of universal primers does have the theoretical advantage of not having to have preconceived ideas about the possible components of the blend, this technique in fact causes a clear bias in the detection of the species in the blend. For instance, in a turkey/chicken blend, without a doubt one of the most plausible frauds, it turned out that a 10% turkey content cannot be detected by the PCR-RFLP technique. Its presence only starts to be revealed from around 25%. This is explained by the fact that the primers, although regarded as universal, amplify the chicken in preference. In order to avoid such a bias phenomenon, the use of species-specific targets is recommended. Until now, we are able to detect adulterations of chicken meat with turkey meat at levels below one percent.

**Nevertheless, the development of a strategy requiring a sole PCR to detect the various animal species in meat products remains very attractive. The use of new technologies (e.g. biochips) and specific capture probes internal to conserved regions would be a solution to the bias problems described before.**

With the aid of the AFLP technique (Amplified Fragment Length Polymorphism), we have succeeded in identifying two bands which in the population under study allow specimens from slow-growing strains to be distinguished from fast-growing strains. The two molecular determinants were isolated, cloned and sequenced : one is specific of slow-growing chickens (333 bp) and the second band is characteristic of fast-growing chickens (372 bp). The two identified markers are apparently correlated to growth rate. However, one may not exclude that these markers simply reflect a tight link with a particular breed used in the slow- or in the fast-growing strains. The exact meaning of these markers is unclear, the more as no homology could be found with known sequences (comparison with sequences registered in international sequence libraries) and hereby for instance give some indications of a possible link to growth. This statement does in no way diminish the usefulness of these markers (especially in so far as verifications for use of JA strain as a slow-growing strain are concerned) but could restrict their domain of application (e.g. valorisation limited to slow-growing strains resulting from a specific breed in the ascendants...).

The choice of AFLP as a technique for investigating the polymorphism of DNA was based on the fact that it does not need any prior knowledge of the genome and is reproducible. Results to date allow us to envisage with optimism the possibility of distinguishing between slow-growing and fast-growing chicken strains according to their molecular determinants. AFLP nevertheless appears to be suitable as an investigative technique for DNA, though we feel it is too cumbersome to use for routine analyses (it can take two days to get a result). **It seems an evidence that development and validation on a representative set of a fast PCR test (results within one day) based on the determinants identified by AFLP has to be considered. A test of this kind could be routinely used by a testing laboratory but requires beforehand that the exact meaning of the determinants should be delimited. This type of test would have another advantage : it could be used with processed products because it does not require, in contrast to AFLP, a good quality DNA.**

Moreover, AFLP allows virtually infinite combinations (restriction enzyme pairs, selective nucleotides). **The AFLP technique**, which our laboratory is proficient in, **can further be used for research into new discriminant bands between fast-growing and slow-growing chicken strains. Characterisation of the slow-growing strains most commonly used commercially could be envisaged in this framework. Commercial exploitation of the research results (patents, analysis kits) is not unrealistic.**

With regard to animal feed, determining the origin of particles by means of near infrared microscopy appears to be the most promising issue for rapid detection of animal proteins and fats in feed. The application of the technique is developed at the Department QUALITY OF AGRICULTURAL PRODUCTS at the GEMBLOUX AGRICULTURAL RESEARCH CENTRE. It requires to create libraries of raw material spectra which include the variety of ingredients that go into animal feed formulations.

At present, the presence of inhibitors (antibiotics or other substances) in animal feed is verified by identifying an inhibiting power with respect to various bacterial strains. Analysis of different raw materials has revealed the inhibiting action of a number of components, in particular the different ones produced by grinding cereals (bran, middlings, wheat feed).

Other matrices (lucerne meal), after aqueous extraction, reveal an area of inhibition. Bacterial strains have been isolated from samples of raw materials showing a positive result. One of these, *Bacillus licheniformis*, which was active against the test strains, is responsible for the production of a molecule used in animal feed: bacitracin. From the chromatographic tests carried out it is evident that this antibiotic is in no way responsible for the positive results. Similar results have been observed with chicken meat samples producing abnormal positive results: a strain of *Klebsiella oxytoca* was isolated from the meat, this bacterium also show a bactericidal effect on the test strains used.

An HPLC method coupled with a fluorescence detector has been developed in order to reveal coccidiostats in feed (sulphamides). The extraction developed and the HPLC parameters confirmed the purity of the peaks obtained.

## *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.

## *Introduction*

## 1. Introduction

### 1.1 Cadre général de la recherche

Les attentes des consommateurs en matière de qualité des aliments peuvent se résumer par : Satisfaction, Service, Sécurité et Santé. La sécurité et la santé constituent les éléments d'une qualité de base des produits alimentaires. A cet égard, des normes sont strictement définies par les législations communautaires et/ou nationales. Ces deux critères ont cependant pris avec les événements récents qui ont touché le secteur de la viande (hormones, ESB, dioxines) une ampleur particulière auprès de la grande majorité des consommateurs. La population a désormais pris conscience des enjeux liés à la sécurité alimentaire et ce critère est de plus en plus assimilé à un facteur de particularité.

Parallèlement à ces réactions de crainte et de méfiance des consommateurs, les produits alimentaires porteurs de signes distinctifs de qualité (labels, appellations d'origine et identifications géographiques, produits issus de l'agriculture biologique et de la production intégrée) se sont largement développés. Par différents aspects, ils répondent aux nouvelles attentes exprimées par les consommateurs et s'inscrivent dans le développement d'une agriculture durable. Des législations de protection de ces filières ont également été élaborées et mises en place ; elles sont parfois accompagnées de mesures financières d'aide.

Les produits de qualité particulière connaissent donc un essor important. L'authenticité de ces produits vendus plus chers et présents sur un marché de plus en plus international est devenue une préoccupation à la fois des autorités, en raison des pertes potentielles de revenus occasionnées en cas de fraude, mais également pour les producteurs honnêtes, qui pâtissent des pratiques déloyales de leurs concurrents et pour le consommateur, qui n'est pas sûr de retrouver dans son assiette un produit à la hauteur de ses attentes.

Lors de l'inventaire des produits agricoles et agro-alimentaires attestant des qualités spécifiques qui a précédé ce projet<sup>1</sup>, la diversité des signes distinctifs existants avait été mise en évidence.

Leur authentification se réfère à des aspects tels que :

- la présence d'ingrédients définis en proportions définies ou leur absence ;
- le respect d'un mode de production, transformation, conservation ;
- l'origine géographique ;
- l'origine génétique.

Des différences de niveaux de garantie apportées par les systèmes de certification avaient été soulignées. Il ressortait clairement des conclusions de cet inventaire<sup>1</sup> que les techniques permettant de contrôler la conformité des produits soumis à une certification pouvaient dans certains cas être insuffisantes et que la crédibilité de ces produits pourrait être remise en cause. Des problèmes importants en matière de contrôle analytique (détection des hormones, détection des antibiotiques, détection des farines animales, problèmes de traçabilité,...) avaient notamment été relevés.

La mise au point de nouvelles méthodes d'analyses est indispensable et doit permettre de mieux contrôler la conformité des produits aux normes complémentaires dictées dans le cadre des productions de qualité certifiée. En ce sens, le projet répond à la demande des organismes certificateurs chargés de ces contrôles.

---

<sup>1</sup> Projet de recherche NP/DD/05 – contrat NP/42/005 : Contrôle de l'authenticité des produits agricoles et agro-alimentaires attestant des qualités spécifiques

Parmi les produits certifiés de qualité spécifique, nous avons choisi de focaliser nos recherches sur le secteur de la viande et en particulier de la filière « poulet de chair ». Ce choix se justifie par l'importance qu'a pris la viande de volaille dans la consommation des ménages au cours de ces dernières années, par l'impact environnemental que peut avoir cette production et par la multiplication des labels et mentions observées dans ce secteur.

## **1.2 Objectifs de la recherche**

L'authentification des produits certifiés consiste à contrôler la conformité du produit final ou des matières premières à des normes de qualité particulière définies dans un cahier des charges au moyen de techniques analytiques appropriées.

Dans le cas présent du poulet de chair, nos efforts se portent sur le contrôle des viandes et de l'alimentation des poulets.

### **1°) Les viandes :**

Dans les productions certifiées telles que le Label Rouge français (indications d'origine géographique), le Label de Qualité Wallon ou relatives à l'agriculture biologique, les cahiers des charges imposent l'élevage de poulets de chair issus de souches à croissance lente qui ne sont pas utilisées en élevages industriels. Ces productions font figurer sur leur étiquette la mention « Poulets fermiers » et l'âge d'abattage (> à 81 jours).

Il faut préciser ici que de nombreuses mentions relatives au mode d'élevage peuvent être présentes sur l'étiquette (« alimenté avec ... % de ... » ; « élevé à l'intérieur – système extensif » ; « sortant à l'extérieur » - règlement (CEE) N° 1538/91). Elles n'impliquent généralement pas l'utilisation de souches à croissance lente. L'âge d'abattage doit parfois être indiqué (par exemple : pour la mention « Elevé à l'intérieur – système extensif », l'âge d'abattage doit être supérieur à 56 jours).

L'authentification des viandes fraîches et produits de viandes de poulet quant à la conformité des espèces, races et souches par des techniques de biologie moléculaire (voir § 2.3) est investiguée.

D'une manière plus générale, l'analyse d'un segment d'ADN mitochondrial doit permettre d'identifier l'espèce animale auquel il appartient. Le but, dans le cadre de ce projet, est de vérifier si des techniques d'amplification génique (PCR) ciblant l'ADN mitochondrial permettent de déterminer que des préparations de viandes réputées n'être faites qu'à partir de poulet ne comprennent malgré tout pas d'autres viandes moins coûteuses. Il s'agit ici de cerner les limites de ces méthodes.

D'autre part, si les caractéristiques morphologiques spécifiques permettent une identification relativement aisée des carcasses entières des poulets certifiés de souches à croissance lente par rapport aux poulets industriels, il n'en va pas toujours de même pour les découpes ou les viandes transformées. Toutefois, les caractéristiques intrinsèques et organoleptiques propres aux poulets de productions certifiées (fermeté des chairs, goût, dépôt de gras sous-cutané limité, ...) sont nettement différenciées et pourraient être identifiées par la spectrométrie dans le proche infrarouge (SPIR), technique rapide, peu coûteuse et non destructive (voir § 2.4).

### **2°) Les aliments :**

Le contrôle de la conformité des aliments composés pour volailles aux prescriptions des cahiers des charges (nature et proportions des différents ingrédients, absence de farines d'origine animale) se fait actuellement par microscopie. Cette méthode de référence est longue et coûteuse et n'est pratiquée que par un seul laboratoire en Belgique. Dans ce cas

également, l'analyse par SPIR et l'utilisation de modèles statistiques d'analyse discriminante sont développées puis testées sur des échantillons indépendants (voir § 3.2).

Enfin, ces mêmes échantillons sont analysés par un microscope-SPIR récemment acquis par le Département Qualité des Productions Agricoles. Cet appareil doit permettre de détecter plus rapidement des farines d'origine animale que par la microscopie traditionnelle (voir § 3.2.2).

Les productions certifiées (viande bovine, porc, poulet, agneau) prévoient une absence totale d'antibiotiques dans l'alimentation. Actuellement, la détection des résidus d'antibiotiques, effectuée par les laboratoires agréés, se résume, non pas à la mise en évidence d'antibiotiques mais bien à la mise en évidence d'un pouvoir inhibiteur présenté par l'aliment étudié. Différentes substances pourraient entraîner l'apparition d'interférences lors de la mise en œuvre de ce test (aliments acides, compléments vitaminés, oligo-éléments). Cela signifie donc que, malgré l'utilisation d'antibiotiques de référence, aucune certitude ne peut être apportée quant à la présence effective d'un antibiotique.

Des techniques analytiques performantes (HPLC) sont disponibles pour réaliser une identification et un dosage d'antibiotiques (Moran *et al.*, 1995). Ces techniques ne sont cependant pas encore applicables à des échantillons d'aliments où un pouvoir inhibiteur a été mis en évidence et où l'on ignore la nature de l'antibiotique. Certaines de ces techniques sont utilisées pour contrôler la teneur en antibiotiques annoncée par le fabricant.

La multiplicité des interférences possibles et un respect strict des normes déjà existantes ne permettent pas aux laboratoires de contrôle et aux organismes certificateurs de se limiter à la seule détection des antibiotiques par méthode microbiologique. Nous nous proposons donc de développer des techniques analytiques capables de déterminer avec certitude l'agent responsable du pouvoir inhibiteur.

***En résumé, ce projet vise à développer des méthodes analytiques accessibles aux organismes de contrôle et de certification permettant d'améliorer la fiabilité de l'authentification des découpes et des produits transformés de poulets issus de modes de production certifiés et contribue à répondre aux demandes des organismes de contrôle belges. Par ailleurs, les résultats attendus bénéficieront également à la plupart des filières de produits animaux de qualité certifiée en Europe.***

*Développement de méthodes de contrôle  
des découpes de poulets  
et produits de viandes de poulets  
de productions certifiées*

## **2. Développement de méthodes de contrôle des découpes de poulets et produits de viandes de poulets de productions certifiées**

### **2.1 Introduction**

Dans la plupart des productions certifiées, les cahiers des charges imposent l'élevage de souches à croissance lente qui ne sont pas utilisées en élevages industriels. Deux approches complémentaires sont proposées ici pour permettre une distinction entre les poulets de chair à croissance lente et les poulets de chair industriels à croissance rapide : la spectrométrie dans le proche infrarouge et la biologie moléculaire. Nous avons également débuté l'étude des potentialités de l'électrophorèse capillaire, technique permettant notamment la séparation des protéines.

#### **2.1.1 La spectrométrie dans le proche infrarouge**

Les caractéristiques intrinsèques et organoleptiques propres aux poulets de productions certifiées (fermeté des chairs, goût, dépôt de gras sous-cutané limité, ...) sont nettement différenciées. En ce qui concerne la viande et les produits carnés, les techniques spectroscopiques (NIR et MIR) ont déjà été utilisées pour le dosage des constituants majeurs (matière grasse, eau, protéines) (Sindic *et al.*, 1993 ; Cozzolino *et al.*, 1996), pour l'estimation de la tendreté et la prédiction de critères de l'analyse sensorielle (Hildrum *et al.*, 1995), pour la classification de carcasses de porcs (de Pedro *et al.*, 1994), pour la détection de fraudes (Thyholt *et al.*, 1998) et pour l'identification de l'origine de viandes (Thyholt *et al.*, 1997).

Compte tenu de la spécificité de l'empreinte spectrale d'un échantillon, la SPIR est couramment utilisée à des fins de classification. Les modèles de classification sont basés sur des techniques chimiométriques telles que l'analyse en composantes principales (ACP), l'analyse factorielle discriminante (AFD) et les réseaux neuronaux (ANN). La littérature mentionne de nombreux exemples d'analyses discriminantes utilisant la spectrométrie proche infrarouge : classification de variétés de blé (Dardenne et Biston, 1986), distinction du riz Basmati (plus coûteux) des autres variétés de riz (Osborne *et al.*, 1993 ; Krzanowski, 1995), authentification de farines de blé (Siriex et Downey, 1993), de jus d'orange (Twomey *et al.*, 1995 ; Scotter et Legrand, 1994), de mélanges de café (Downey, 1996),... L'IRTF (spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier) est également utilisée pour les jus de fruit (Meurens *et al.*, 1994 ; Holland *et al.*, 1996).

#### **2.1.2 La biologie moléculaire**

Plusieurs sondes d'ADN ont été décrites pour caractériser des préparations de viandes des espèces animales couramment consommées, volailles comprises (Meyer et Candrian, 1996). Dans l'état actuel des connaissances, la méthode semblant la plus prometteuse est celle de la reconnaissance des espèces d'après l'ADN mitochondrial (Lefrançois *et al.*, 1997). Présent en plusieurs exemplaires dans chaque cellule, il fournit des cibles abondantes pour réaliser une amplification par PCR. C'est là un avantage appréciable pour l'analyse de produits soumis à des traitements drastiques (cuisson, séchage, fumaison, autoclavage...) susceptibles d'entamer l'intégrité d'une large fraction des segments d'ADN recherchés (Unselde *et al.*, 1995). De plus, vu la vitesse évolutive de l'ADN mitochondrial plus grande que celle de l'ADN nucléaire, il



convient particulièrement bien pour la discrimination entre espèces, voire entre sous-espèces (Kocher *et al.*, 1989). Le gène cible actuellement le mieux documenté pour la reconnaissance des espèces (volaille comprise) est celui du cytochrome b (Barallon *et al.*, 1996; Meyer et Candrian, 1996) qui offre l'avantage d'un "screening" simultané de plusieurs espèces par la technique de la PCR-RFLP (Meyer *et al.*, 1995).

Si théoriquement, rien ne s'oppose à l'exploitation de techniques comparables pour vérifier et attester l'emploi de races de poulets particulières dans des produits carnés (ex: saucisses, saucissons), la difficulté réside dans la recherche de déterminants moléculaires.

### 2.1.3 L'électrophorèse capillaire

L'électrophorèse capillaire (EC ou HPCE pour High Performance Capillary Electrophoresis) est née de l'association des mécanismes de séparation de l'électrophorèse (différence de mobilité des solutés chargés dans un champ électrique) et des concepts d'instrumentation de la chromatographie. La séparation des solutés est réalisée dans un capillaire en silice fondue (25 à 75  $\mu\text{m}$  de diamètre interne) auquel de hautes tensions (10 à 30 kV) et des champs électriques intenses (100 à 500 V/cm) sont appliqués. La technique présente l'avantage de ne nécessiter que de très petits volumes d'échantillon (1 à 50 nl injectés).

L'électrophorèse capillaire a déjà été utilisée pour la séparation des protéines sarcoplasmiques chez le poisson (LeBlanc *et al.*, 1994) et la différenciation d'espèces de poissons (Gallardo *et al.*, 1995). Plus récemment, Cota-Rivas et Vallejo-Cordoba (1997) ont utilisé la technique pour distinguer des viandes de bœuf, de dinde et de porc sur base des profils obtenus avec les protéines sarcoplasmiques et myofibrillaires.

Les protéines sarcoplasmiques constituent 30 à 35 % des protéines totales des muscles squelettiques. On y retrouve une hétéroprotéine, la myoglobine, responsable de la pigmentation "rouge" des muscles.

Les protéines myofibrillaires comprennent des protéines contractiles (myosine et actine) et des protéines régulatrices de la contraction (tropomyosine, troponines,  $\alpha$ - et  $\beta$ -actinine, protéine M, protéine C). Il s'agit de protéines le plus souvent solubles dans des solutions salines de faible force ionique. En technologie alimentaire, ces protéines influencent les qualités culinaires et commerciales des viandes ; par exemple, elles déterminent la capacité de rétention d'eau et à un degré moindre la tendreté d'une viande.

Les normes de productions des poulets de chair issus de souches à croissance lente conduisent à une qualité organoleptique réellement différente. Il n'est pas interdit de penser que cette différence puisse se traduire par des distributions qualitativement ou quantitativement différentes des protéines musculaires.

## 2.2 Echantillonnage de viandes fraîches de poulets et produits de viandes de productions certifiées

### 2.2.1 Inventaire et typologie des produits commercialisés dans le pays

#### 2.2.1.1. Introduction

La production avicole se caractérise dès le début des années soixante par une évolution des techniques d'élevage orientée essentiellement vers l'augmentation des rendements et des quantités produites. Les gains réalisés en sélection notamment au niveau de la vitesse de croissance (il fallait 84 jours en 1950 pour produire un poulet de 1,8 kg, aujourd'hui il n'en faut plus que 42) ont permis d'abattre les poulets de plus en plus jeunes. Cette augmentation de la vitesse de croissance semble s'être accompagnée d'effets pervers comme un attendrissement excessif de la viande et une diminution de son goût (Touraille *et al.*, 1985 ; Culioli *et al.*, 1990 ; Girard *et al.*, 1993).

Malgré ces défauts, la viande de volaille n'a cessé de prendre de l'importance dans la consommation des ménages au cours de ces dernières années et arrive désormais en seconde position derrière la viande de porc (en Belgique, 23 kg par an et par habitant). Une bonne image de marque et un prix très compétitif par rapport aux autres viandes ont contribué à son succès.

Les attentes des consommateurs sont de deux types :

Une majorité demande des produits courants au meilleur prix. Cette catégorie de produits n'est pas uniquement destinées aux ménages à bas revenu mais est également écoulee dans les collectivités et les circuits de restauration rapide. Ils sont aussi utilisés pour la confection industrielle de plats préparés où un faible prix est recherché préférentiellement aux qualités organoleptiques.

D'autres privilégient la recherche de produits plus typés, qu'ils sont prêts à payer plus cher pour satisfaire leurs attentes en matière de fraîcheur, de qualités organoleptiques. Certains sont également attentifs à des critères tels que le bien-être animal ou le respect de l'environnement.

Il semble que le consommateur apprécie de plus en plus ce dernier type de produit. L'exemple français est particulièrement illustratif. A la fin des années 60, la production de poulets Label Rouge représentait seulement 3 millions de poulets. En 1995, elle atteignait 76 millions d'individus. Cette demande croissante des consommateurs s'est encore accentuée avec la crise de la vache folle; au cours du second trimestre 1996, les achats de poulets sous Label Rouge ont encore progressé de 11 % (source SYNALAF). En 1997, les poulets Label Rouge représentent 30 % de la consommation de poulet entier. Le poids économique de la filière avicole Label Rouge est également non négligeable, avec plus de 5300 éleveurs, soit près de la moitié des éleveurs de volailles répertoriés en France et quelque 216 entreprises pour un chiffre d'affaires d'environ 2,5 milliards de francs français.

Ce succès ne semble pas se démentir puisque les produits sous Label Rouge, labels régionaux et certification de conformité avec indication géographique protégée ont vu leurs ventes augmenter de près de 16 % en 1999 (+/- 8,3 milliards de francs

français). La volaille, qui en représente la plus grande partie, a vu son chiffre d'affaire augmenter de 5 % malgré la crise de la dioxine (source RIA - juin 2000).

En Belgique également, ces produits sont très appréciés. En 1996, notre pays était en effet le premier importateur avec 1,7 millions de volailles (Le Boucher, 1997). Si l'auto-provisionnement de la Belgique en poules et poulets de chair est assuré depuis de nombreuses années, 90 % des volailles de qualité consommées sont importés.

La Wallonie restée en retrait par rapport à cette tendance vers la production industrielle (1,3 millions de poulets de chair en 1997 soit 5,9 % des poulets élevés en Belgique) dispose depuis une dizaine d'années d'une filière de volailles de qualité : l'asbl UNIPROVOLA (Union Interprofessionnelle de Producteurs de Volailles sous Label). Dans cette filière, l'ensemble des intervenants, de l'accoureur au distributeur en passant par l'éleveur, le producteur d'aliment, l'abatteur, ... s'engagent à respecter un cahier des charges reconnu au niveau du gouvernement wallon (voir annexe 2) et acceptent un contrôle par un organisme certificateur.

La crise de la dioxine a très certainement renforcé la demande pour des produits de « qualité ».

### 2.2.1.2. Catégories de poulet de chair

Face aux attentes des consommateurs, on observe une forte segmentation du secteur et des modes de production très différents.

Selon une étude réalisée en France par l'ITAVI (Van der Horst, 1988), on distingue couramment aujourd'hui six types de poulets :

**Le coquelet** est abattu à l'âge de 30-35 jours. Son poids vif à l'abattage est de l'ordre de 950 à 1000 grammes.

**Le poulet export** est abattu entre 40 et 42 jours. Il est congelé et destiné à l'exportation. Son poids vif à l'abattage est de 1,3 à 1,5 kg.

**Le poulet standard** est un poulet abattu à l'âge de 47-49 jours et d'un poids vif à l'abattage compris entre 1,7 et 1,9 kg

**Le poulet de marque** est caractérisé par une marque commerciale qui définit un produit différent du standard. Ce type de poulet est abattu à l'âge de 70 jours et pèse entre 1,8 et 2,1 kg vif.

**Le poulet label** ne peut être abattu avant l'âge de 81 jours alors qu'il a atteint un poids vif de +/- 2,2 kg. Il est élevé selon des normes strictes réunies dans un cahier des charges et dont l'application est contrôlée par un organisme certificateur.

**Le poulet d'appellation d'origine** est un poulet dont l'élevage est réalisé dans une zone géographique limitée et selon des conditions très strictes.

La grande diversité des systèmes de production et des produits avicoles permet d'établir cette autre classification, tirée du travail "Les volailles label : situation et

perspectives” réalisée par le Professeur André Théwis, qui tout en rejoignant celle développée ci-dessus la simplifie et précise certains critères :

**Le poulet industriel** : ce type de poulet est élevé selon un mode de production intensif poussé à l’extrême. Il est issu de souches à croissance rapide et à un très bon indice de consommation. Ces caractéristiques lui permettent d’atteindre son poids d’abattage à 42 jours voire moins. L’alimentation à haute densité énergétique est enrichie par l’ajout de graisses et de facteurs de croissance autorisés suivant les modalités prévues par la législation. La densité des animaux est élevée (> 20 têtes/m<sup>2</sup>) dans des poulaillers. Il n’existe pas de parcours extérieur. L’ensemble de ces éléments conduisent à l’obtention d’une viande certes tendre mais peu goûteuse et flasque.

**Le poulet label (par exemple : Le Poulet Villages–Label de Qualité Wallon)** : le poulet label est produit sous une marque collective. Elevé selon un cahier des charges très strict, il possède des caractéristiques lui conférant un niveau de qualité « supérieur » distinct de la production intensive, particulièrement au niveau de la fermeté et du goût de la viande. Il est issu d’une souche à croissance lente et ne peut être abattu avant 81 jours. Son alimentation à faible densité énergétique ne peut contenir de graisse, ni de facteur de croissance. La densité d’animaux au sol est faible (maximum 11 poulets/m<sup>2</sup>) et l’accès à un parcours extérieur est prévu à partir de 6 semaines. Ces normes de production permettent d’obtenir une viande ferme et savoureuse, peu grasse en dehors de la peau (un extrait de l’Arrêté du Gouvernement Wallon du 29 septembre 1994 portant sur l’attribution de la dénomination "Label de Qualité wallon - Poulet de Chair" et fixant les normes de production est repris en annexe 2). Le système de production et le produit final sont analogues au poulet “Label Rouge” français, signe distinctif bien identifié.

Le respect des labels est assuré par des organismes certificateurs privés, indépendants et agréés par les pouvoirs publics (par exemple : PROMAG). Ils sont chargés de vérifier le respect du cahier des charges tout au long de la filière du producteur au boucher.

**Le poulet de marque** : il s’agit d’un poulet de souche à croissance rapide ou intermédiaire. L’âge d’abattage est compris entre 49 et 63 jours. Toutes les caractéristiques sont intermédiaires par rapport aux 2 catégories précédentes. Ce type de poulet est vendu sous une marque commerciale bien identifiée avec des caractéristiques organoleptiques qui sont tantôt plus proches de l’industriel, tantôt plus proches du label suivant le choix de la souche, l’âge d’abattage. En général, il n’a pas accès à un parcours à l’extérieur.

Outre ces classifications, il est important de signaler également l’existence de nombreux labels et mentions faisant référence, entre autres, à l’alimentation (par exemple : poulet élevé au maïs) ou au mode de production (par exemple: poulet issu de l’agriculture biologique),...Le règlement européen 1538/91 du Conseil établissant des normes de commercialisation pour les volailles reprend à son annexe IV les différentes appellations que l’on peut donner aux volailles selon le type d’élevage. Les conditions à remplir pour bénéficier de l’appellation “élevé à l’intérieur – système extensif”, “sortant à l’extérieur”, “fermier élevé en plein air” et “fermier élevé en liberté” sont décrites : ce sont la densité au sol, l’âge d’abattage, le mode d’élevage (parcours extérieur ou pas), la formule alimentaire,...

Les poulets de marque font parfois l'objet de certification de conformité. Elles permettent aux professionnels de distinguer leurs produits en mettant en avant certaines caractéristiques particulières choisies pour améliorer la qualité ou l'image du produit. Comme dans le cas des labels, les certifications de conformité s'appuient sur un document qui est soit un référentiel technique (un cahier des charges) ou une norme réglementaire (normes européennes évoquées ci-dessus). Un contrôle externe est ici aussi assuré par un organisme certificateur agréé.

Le prix final du produit est très variable : en principe, le plus bas pour le poulet industriel est de 100 à 150 F/kg, le plus élevé pour le poulet label est de 220 à 300 F/kg.

La production et le produit final sont soumis à des contrôles plus ou moins strictes :

- le poulet industriel : contrôle interne ;
- le poulet de marque : contrôle interne et parfois externe (produit certifié) ;
- le poulet label : contrôle par organisme certificateur agréé.

Le contrôle du respect des appellations des volailles ainsi que des mentions reprises sur l'étiquetage peut être effectué par le Ministère de l'Agriculture.

Afin de dresser un inventaire complet des produits de volailles disponibles en Belgique, nous nous sommes adressés aux chaînes de grands magasins. Deux d'entre-elles (Delhaize et GB) ont accepté de nous donner les coordonnées de fournisseurs. Nous avons alors contacté soit par téléphone ou par courrier les firmes suivantes : BELKIP N.V., NIEUWE VERSPREEUWEN N.V., FLANDREX N.V., et MAISKI N.V. pour la Belgique ainsi que la firme DUC en France. Seule, NIEUWE VERSPREEUWEN N.V. nous a renvoyé une documentation concernant les volailles landaises St Sever.

Le tableau suivant, réalisé à partir des informations mentionnées sur l'étiquette des poulets que nous avons analysés, permet déjà d'établir certains critères de comparaison.

**Tableau 1** : Classification des poulets analysés sur base de critères mentionnés sur l'étiquette

Marque	Signe distinctif	Organisme certificateur	Age d'abattage	Alimentation	Mention concernant le parcours	Restrictions Particulières
<b>Coucou de Malines</b>			Minimum 56 jours	70 % de céréales		
<b>Delhaize – Coucou de Malines</b>		Authentification de la race par le “ Club Spécial du Coucou de Malines ”	Minimum 56 jours	70 % de céréales	Elevé à l'intérieur Système extensif (?)	
<b>Delhaize – Poulet biologique</b>	AB	Biogarantie	Minimum 91 jours	Plus de 90 % de produits issus de l'agriculture biologique	Elevé en plein air	
<b>Delhaize – Poulet fermier du Sud-Ouest</b>			Minimum 91 jours	80 % de céréales	Elevé en plein air	
<b>Delhaize – Poulet de grains</b>		Contrôle du Ministère de l'Agriculture		70 % de froment, orge, millet		
<b>Delhaize – Poulet maïs</b>		Contrôle du Ministère de l'Agriculture		70 % de maïs, soja, luzerne		
<b>Duc</b>	Atout Certifié Qualité	Vericert	Non précisé	95 % de végétaux (70 % de céréales 50 % de maïs) + 5 % de vitamines et minéraux		<b>Pas</b> d'antibiotiques, d'activateurs de croissance et de protéines animales
<b>Esliè Freslon Poulet biologique</b>	AB	Ecocert France		90 % d'aliments issus de l'agriculture biologique	Elevé en plein air	
<b>Loué – Poulet fermier noir</b>	Label Rouge	Quali Ouest		80 % de céréales	Elevé en liberté	
<b>Loué - Poulet fermier blanc</b>	Label Rouge		Minimum 87 jours	80 % de céréales 15 % de végétaux 5 % de minéraux	Elevé en liberté	
<b>Maïski - Poulet de maïs</b>		Quality Control	Non précisé	97 % de végétaux (>70 % de maïs) 3 % de vitamines et minéraux		

**Tableau 1** : Classification des poulets analysés sur base de critères mentionnés sur l'étiquette

Marque	Signe distinctif	Organisme certificateur	Age d'abattage	Alimentation	Mention concernant le parcours	Restrictions Particulières
<b>Maïski – Coucou de Malines</b>		Quality Control	Non précisé	97 % de végétaux plus de 70 % de maïs 3 % de minéraux et vitamines		
<b>Maïski – Cordon blé</b>				97 % de céréales 70 % de grains 3 % de vitamines		
<b>Noir de Challans</b>	Label Rouge	QVB		Plus de 75 % de céréales	Elevé en plein air	
<b>Poulet fermier bocage vendéen</b>	Label Rouge		Minimum 81 jours	80 % de grains	Elevé en plein air	
<b>Poulet vendéen maïs</b>	Label Rouge					
<b>Poulet Villages</b>	Label de Qualité wallon	Promag	Minimum 81 jours	Voir annexe n°2	Elevé en plein air	Voir annexe n°2
<b>Souvenir du terroir</b>			Minimum 81 jours	80 % de grains	Elevé en plein air	
<b>St Sever – Poulet des Landes</b>	Label Rouge		Minimum 81 jours	80 % de céréales	Elevé en plein air	
<b>St Sever – Poulet Jaune des Landes</b>	Label Rouge			80 % de céréales	Elevé en liberté	
<b>St Sever – Poulet Noir des Landes</b>	Label Rouge			80 % de céréales	Elevé en liberté	

L'annexe 2 reprend les normes relatives au "Poulet de Chair - Label de Qualité Wallon" et au "Poulet de Chair - Biogarantie (Agriculture Biologique)".

### 2.2.1.3. Caractéristiques organoleptiques d'une viande de poulet de qualité

L'objectif des productions "label" est d'atteindre une qualité organoleptique supérieure des viandes produites. Les caractéristiques organoleptiques d'une viande peuvent être appréciées par les critères que sont la tendreté, la jutosité, la couleur et la flaveur.

La tendreté est la facilité avec laquelle la viande se laisse trancher et mastiquer. La structure des fibres musculaires, la qualité et la quantité de collagène contenu dans la viande influencent directement la tendreté. Contrairement aux autres viandes, les consommateurs apprécient que la viande de volaille présente une certaine fermeté (Lassaut *et al.*, 1984).

La jutosité est l'impression d'humidité perçue lors de la mastication. Elle dépend du pouvoir de rétention d'eau et de la teneur en lipides de la viande (Girard *et al.*, 1988).

La couleur est fonction de la répartition des différents types de fibres musculaires.

La flaveur correspond aux perceptions olfactives et gustatives perçues lors de la dégustation. Elle dépend de la teneur et de la nature des lipides intramusculaires ainsi que des composés issus de l'oxydation des lipides lors de la maturation et de la cuisson (Gandemer, 1997).

### 2.2.1.4. Facteurs susceptibles d'influencer la qualité des poulets

Sauveur (1997) et Mary (1998) ont repris les études analysant les principaux facteurs influençant la qualité du poulet label. Au sens large, ils peuvent être classés en facteurs intrinsèques à l'animal (l'âge à l'abattage, le génotype et le sexe) et facteurs extrinsèques (l'alimentation, les conditions de transport et d'abattage).

#### a. L'effet de l'âge

L'âge d'abattage exerce une influence essentielle sur les caractéristiques organoleptiques de la chair (Touraille *et al.*, 1981).

La texture de la viande devient plus ferme avec l'âge (Touraille *et al.*, 1981 ; Rabot *et al.*, 1996) en raison d'une diminution de la solubilité du collagène (Bastiaens *et al.*, 1992).

L'intensité de la flaveur augmente également avec l'âge. Ce paramètre est à mettre en liaison avec la maturité sexuelle de l'animal. Un âge d'abattage de 81 jours semble un bon compromis car il est postérieur à la puberté mais évite que la viande ne devienne trop ferme (Sauveur, 1997).

L'influence de l'âge d'abattage sur la jutosité de la viande est plus controversée. Si certains auteurs estiment qu'une augmentation de l'âge accroît les pertes d'eau à la cuisson (Touraille *et al.*, 1981 ; Rabot *et al.*, 1996), d'autres n'observent aucune corrélation (Culioli *et al.*, 1990). Dans le cas de la viande de poulet, une diminution de



la jutosité n'apparaît pas comme un défaut aux consommateurs qui reprochent justement aux volailles standard une consistance trop aqueuse (Touraille *et al.*, 1985).

Quoi qu'il en soit, les consommateurs apprécient généralement les poulets plus âgés. Si la viande de ces individus est moins tendre, son goût est plus prononcé.

#### *b. L'effet du génotype*

Etant donné l'importance de l'âge pour la qualité du poulet, le choix de souches à croissance lente se justifie totalement dans le cas de productions sous label. Il est en effet impossible d'élever jusqu'à 12 semaines des poulets à croissance rapide, car leur poids et leur engraissement seraient excessifs et entraîneraient des troubles locomoteurs et physiologiques.

Depuis les années 60, des lignées ont été sélectionnées et croisées pour aboutir à des individus présentant une croissance ralentie. La vitesse de croissance n'étant plus le critère recherché, la sélection s'est orientée vers des critères plus qualitatifs, tels que la rusticité des animaux, la conformation, le rendement en muscle, la répartition des graisses, l'aspect de la peau, la finesse du squelette, la densité des plumes, la facilité de plumaison,...(Sauveur, 1997 ; Rabot *et al.*, 1999).

Une sélection directe sur les caractères organoleptiques ne semble cependant pas réalisable : l'héritabilité de ces caractères est difficilement quantifiable par des tests organoleptiques dont la variabilité est trop élevée. Dans le cas présent, le choix de la souche n'a d'influence que parce qu'il permet de prolonger la durée d'élevage.

#### *c. L'effet du sexe*

A âge égal, les poulets femelles montrent classiquement un engraissement plus élevé que les poulets mâles. Ceci mis à part, le sexe n'a pas d'effet particulier sur les caractéristiques organoleptiques.

#### *d. L'effet de l'alimentation*

Etant donné la période d'élevage pratiquement doublée des poulets label par rapport aux poulets industriels, l'aliment choisi aura une valeur énergétique limitée de manière à ne pas favoriser une prise de poids trop rapide et éviter un engraissement superflu.

Si peu de travaux ont évalué l'impact de l'alimentation sur les caractéristiques organoleptiques du poulet, des matières premières alimentaires spécifiques (farines et huiles de poissons, certains types de tourteaux de colza) sont en revanche connues pour altérer la flaveur de la viande (Sauveur, 1997).

#### *e. L'effet des conditions d'élevage*

Il semble que la densité des poulets au sol ne soit pas le facteur essentiel expliquant les différences physico-chimiques ou organoleptiques observées, même s'il peut influencer l'aspect extérieur des carcasses (brûlures) (Deroanne *et al.*, 1983).

Une température ambiante et un éclairage constant plutôt que fractionné pourrait également avoir une légère incidence notamment en influençant les quantités d'aliments ingérées (Sauveur, 1997).

La présence d'un parcours extérieur apparaît souvent comme un argument essentiellement commercial mettant en avant le respect du bien-être des animaux. S'il ne modifie pas de façon sensible les qualités organoleptiques de la viande de poulet, il influence la tendreté des filets (Bastiaens *et al.*, 1991) et la composition corporelle.

D'un point de vue environnemental, l'accès à un parcours extérieur constitue, selon certains, un avantage en assurant un recyclage des fientes émises à l'extérieur. Cependant, les poulets restent très souvent concentrés à proximité du poulailler où ils déposent le plus de fientes. La durée de vie de l'animal et l'indice de consommation des souches utilisées dans les productions label conduisent à un bilan par tête négatif (rejets azotés plus importants) pour ce mode de production. Néanmoins, la taille limitée des exploitations imposée par le cahier des charges (maximum 13.200 individus) favorise une bonne intégration dans l'environnement, réduit les nuisances pour le voisinage et les aspects négatifs de la production.

*f. L'effet des conditions de transport et d'abattage*

Les conditions de transport et d'attente avant l'abattage peuvent être une cause majeure de stress et de déclassement des carcasses. Dans le cas des productions sous label, si les conditions préconisées visent à limiter le stress, l'effet d'un brusque changement de densité entre l'élevage et le transport n'a pas été envisagé (Rémignon et Culioli, 1995).

*g. Conclusions*

Les attentes des consommateurs en matière de caractéristiques organoleptiques des viandes de volailles montrent qu'ils apprécient une chair ferme et une saveur prononcée (Lassaut *et al.*, 1984 ; Touraille *et al.*, 1985).

Plusieurs études scientifiques se sont attachées à mettre en évidence les facteurs de production susceptibles de modifier la qualité de la viande de volailles.

Le principal facteur conduisant à une qualité organoleptique différente de la viande de poulet est un âge d'abattage proche de la maturité sexuelle. Face à ce paramètre incontournable, il a été nécessaire de sélectionner des individus dont la vitesse de croissance était moins élevée (souches à croissance lente). Une alimentation adaptée a également été mise au point afin d'obtenir des individus répondant aux critères commerciaux.

Ces facteurs associés à la présence d'un libre parcours, dont l'influence sur la qualité de la viande apparaît comme très limitée, confèrent à ces productions une image positive de production plus traditionnelle, respectueuse du bien-être des animaux et de l'environnement, qui rassure le consommateur et en fait le succès.

Ces choix conduisent à des coûts de production nettement plus élevés et justifient un différentiel de prix parfois important. Néanmoins, il est essentiel pour la crédibilité de ces productions de pouvoir les distinguer de manière objective. La mise au point de techniques analytiques d'authentification apparaît comme une nécessité.

### 2.2.2 Collecte des échantillons

148 poulets et 9 découpes (4 cuisses et 5 blancs) ont été analysés. Nous nous sommes attachés à diversifier notre approvisionnement en allant dans différentes grandes surfaces (Champion, Delhaize, GB Partners, Match, Maxi GB, Nopri) à Gembloux et ailleurs (Bouge, Kraainem, Morlanwelz, Sombreffe, Wavre) ou auprès de Uniprovola, groupement de producteurs commercialisant le “ Poulet Villages - Label de Qualité Wallon ”.

Les deux groupes constitués dès le début du projet ont été étendus à de nouveaux individus et à de nouvelles marques :

Le groupe « Poulets issus de souches à croissance lente » (74 individus) est composé de :

- 34 poulets Villages - Label de Qualité Wallon
- 7 poulets Loué - Label Rouge
- 3 poulets Vendéen - Label Rouge
- 1 poulet Vendéen Maï s - Label Rouge
- 2 poulets « Souvenir du Terroir »
- 4 poulets « Bio »
- 1 poulet « Bio » - Delhaize
- 3 poulets des Landes - Saint Sever - Label Rouge
- 2 Coucou de Malines - Maï ski
- 2 poulets du Sud-Ouest - Delhaize
- 1 poulet noir de Challans - Label Rouge
- 14 poulets de la souche à croissance lente ISA 657 élevés dans le cadre de l'expérimentation animale menée au sein de l'Unité de Zootechnie de la FUSAGx

Le groupe « Poulets industriels » (57 individus issus de souches à croissance rapide + 9 découpes) est composé de :

- 7 poulets Père Dodu prêts à cuire
- 8 poulets Père Dodu maï s
- 3 poulets Match prêts à cuire
- 3 poulets GB prêts à cuire
- 2 poulets Nopri prêts à cuire
- 4 poulets Delhaize prêts à cuire
- 2 poulets Delhaize maï s
- 1 poulet de grains - Delhaize
- 9 poulets « Kip poulet »
- 3 poulets « Le Kerval »
- 1 poulet sans marque
- 14 poulets issus d'une souche à croissance rapide « chair blanc » élevés dans le cadre de l'expérimentation animale menée au sein de l'Unité de Zootechnie de la FUSAGx
- 5 découpes de blancs
- 4 découpes de cuisses

Un groupe de « Poulets certifiés » a également été constitué. Il reprend des poulets de qualité intermédiaire élevés selon un cahier des charges imposant des contraintes particulières surtout au niveau alimentaire. Ces poulets n'appartiennent pas

à des souches à croissance lente et sont donc abattus à un âge intermédiaire entre les poulets industriels et les poulets à croissance lente. Ce groupe (17 individus) est composé de :

- 7 poulets Duc
- 3 Coucou de Malines – Delhaize
- 2 Coucou de Malines
- 2 poulets Maï s Maï skip
- 2 poulets Maï ski - Cordon Blé
- 1 poulet Maï s Plus – Maï ski

Ce nouveau groupe comporte par rapport aux deux autres un nombre restreint d'individus. Actuellement, les modèles de discrimination développés ne prennent en compte que deux groupes (poulets à croissance lente et poulets industriels) ; le groupe des poulets certifiés est inclus dans celui des poulets industriels.

La liste des poulets analysés est reprise dans l'annexe 3.

### **2.3 Authentification de l'origine génétique des produits de viande**

#### **2.3.1 Mise au point d'une méthode d'extraction d'ADN**

Une méthode d'extraction d'ADN a été testée sur des échantillons de viande de poulet. Ces échantillons consistent en homogénats de muscle et de peau obtenus par passage au mixer des tissus précités. Il s'agit en fait des préparations élaborées pour effectuer les mesures par la SPIR mais dont l'excédent a été conservé à l'état congelé pour réaliser les extractions d'ADN.

Brièvement décrite la méthode d'extraction comprend les étapes successives suivantes:

- 1) pesée de 200 mg du broyat muscle/peau après décongélation d'une fraction prélevée sur l'échantillon conservé à -50°C,
- 2) incubation durant 30 min. à 55°C dans un tampon à base de SDS et de protéinase K,
- 3) élimination des protéines par des extractions au phénol/chloroforme,
- 4) précipitation de l'ADN à l'éthanol.

Le protocole complet est détaillé en annexe n° 4.

Ce protocole d'extraction est le résultat d'une fusion entre deux protocoles différents, l'un spécifiquement renseigné comme applicable au foie (nous nous sommes assuré qu'il fonctionne bien sur foie de poulet) et l'autre valable, entre autres, pour récolter le matériel génétique de micro-organismes et de graines.

Appliqué à la viande, ce protocole présente un rendement d'extraction en ADN appréciable (au moins 5µg d'ADN à partir de 200mg d'échantillon) et le matériel récolté se prête bien à l'amplification par PCR tant pour des cibles situées dans l'ADN nucléaire (testé avec des amorces universelles dérivées des séquences nucléotidiques codant pour l'ARN ribosomique) que pour celles localisées au sein de l'ADN mitochondrial (testé avec des amorces issues des données relatives au cytochrome *b* - voir § 2.3.2). La qualité de l'ADN obtenu permet également son utilisation en AFLP (voir§ 2.3.3.1).

Des essais ont permis de vérifier que la méthode d'extraction fonctionne également sur des produits de charcuterie et même sur des farines de viande.

### **2.3.2 Essais d'amplification de segments du gène du cytochrome *b***

#### **2.3.2.1 La technique PCR-RFLP appliquée au gène du cytochrome *b***

La littérature renseigne l'usage de segments du cytochrome *b* pour arriver à déterminer l'espèce animale dont provient un morceau de viande ainsi que la ou les espèces entrant dans la composition de préparations de viande tels du saucisson ou du pâté (Meyer *et al.*, 1995 ; Zimmermann *et al.*, 1998).

En tant que cible le gène du cytochrome *b* présente l'avantage de relever de l'ADN mitochondrial. Cela lui confère un phénomène naturel d'amplification. Une cellule renferme en effet un nombre élevé de mitochondries. Une cible mitochondriale peut ainsi être mille fois plus abondante qu'une cible nucléaire. Par ailleurs, le cytochrome *b* présente dans sa séquence de nombreux segments particulièrement bien conservés au cours de l'évolution. C'est dans de telles régions bien conservées que sont localisées les amorces utilisées pour effectuer la PCR et il est alors possible d'avoir une seule paire d'amorces pour analyser simultanément la présence de plusieurs espèces animales. Quelles que soient les espèces présentes dans l'échantillon cela n'influencera pas la taille du produit d'amplification obtenu. C'est lors de l'analyse de restriction consécutive à la PCR que des profils caractéristiques de l'une ou l'autre espèce seront identifiés.

#### **2.3.2.2 Constance de la présence de sites spécifiques au poulet dans les segments du gène du cytochrome *b***

Pour que la PCR-RFLP puisse être utilisée à des fins d'identification d'une espèce animale, il est indispensable que les sites de restriction considérés comme caractéristiques de l'espèce au sein d'un segment d'ADN donné soient présents chez tous les individus de l'espèce. Pour le poulet, cela devait encore être vérifié sur un nombre suffisant de sujets.

Nous avons pu montrer que les restrictions par *NcoI* (65 poulets analysés: 28 industriels et 37 fermiers) et par *RsaI* (52 poulets analysés: 25 industriels et 27 fermiers) fournissent toujours les mêmes profils caractéristiques du poulet avec les segments de 359 bp et 981 bp du gène du cytochrome *b* obtenus par amplification (Figure 1). Ceci souligne qu'il ne semble pas y avoir de polymorphisme pour ces sites chez le poulet, du moins dans les segments considérés.

```

14881 aaaaataaac taatggcacc caacattcga aaatcccacc cctactaaa aataattaac
14941 aactccctaa tcgacctccc agcccatcc aacatctctg cttgatgaaa tttcggtccc
      5' aa tcgacctccc agcccatcc aacat 3' (CBZ1)
      5' ccatcc aacatctctg cttgatgaaa 3' (CBM1)
15001 ctattagcag tctgcctcat gacccaaatc ctcaccggcc tactactagc catgcactac
15061 acagcagaca catccctagc cttctcctcc gtagccaca cttgccgga cgtacaatac
      RsaI
15121 ggctgactca tcggaatct ccacgcaaac ggcgcctcat tcttcttcat ctgtatcttc
15181 cttcacatcg gacgaggcct atactacggc tctacacct acaaggaaac ctgaaacaca
15241 ggagtaatcc tctcctcac actcatagcc accgccttgg tgggctatgt tctcccatgg
      NcoI
      3'acc
15301 ggccaaatat cattctgagg ggccaccgtt atcacaacc tattctcagc aattccctac
      ccggtttata gtaagactcc ccg 5' (CBM2)
15361 attggacaca ccctagtaga gtgagcctga gggggatttt cagtcgacaa cccaaccctt
15421 acccgattct tcgctttaca cttcctcctc ccctttgcaa tcgcaggat tactatcatc
15481 cacctcacct tctacacga atcaggctca aacaaccccc taggcatctc atccgactct
15541 gacaaaattc catttcaccc atactactcc ttcaaagaca ttctgggctt aactctcata
15601 ctcaccccat tctaactact agccctattc tcccccaacc tcttaggaga ccagaaaaac
15661 ttcaccccg caaaccact agtaaccccc ccacatatca aaccagaatg atatcttcta
15721 ttgcctatg ccatcctacg ctccatcccc acaaaacttg gaggtgtact agccctagca
15781 gcctcagtcc tcctcctctt cctaattccc ttctccaca aatctaaaca acgaacaata
15841 accttcggac cactctccca aaccctattc tgacttctag tagccaacct tcttatccta
15901 acctgaatcg gaagccaacc agtagaacac cccttcatca tcattggcca aatagcatcc
      3' acttagc cttcggttgg tcactttgt 5' (CBZ2)
15961 ctcttact tcaccatcct acttatctc ttcccacaa tcggaact agaaaacaaa
16021 atactcaact actaaatac tctaatagtt tatgaaaaac attggtcttg taaacaaaa

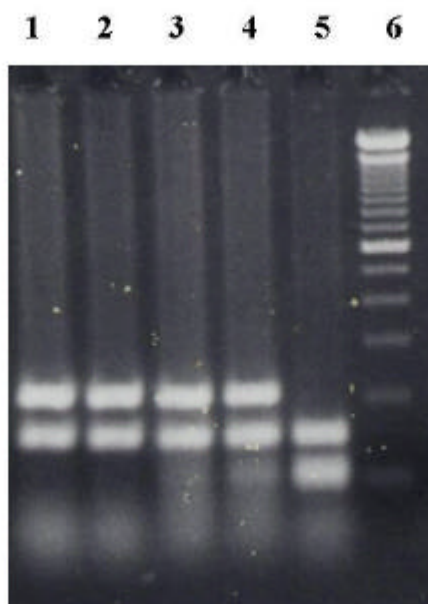
```

**Figure 1:** Séquence du gène du cytochrome *b* du poulet (en bleu) d'après l'entrée X52392 de la banque de données EMBL/Genbank reprenant les 16775 bp de l'ADN mitochondrial du poulet. La numérotation des bases au sein de l'ADN mitochondrial est celle de l'EMBL/Genbank. Les paires d'amorces CBM1/CBM2 et CBZ1/CBZ2 livrent respectivement les fragments de 359 bp (Meyer *et al.*, 1995) et 981 bp (Zimmermann *et al.*, 1998) par PCR. La localisation des sites *NcoI* et *RsaI* fournissant un profil PCR-RFLP typique du poulet est renseignée.

### 2.3.2.3 Analyses de mélanges poulet-dinde

Des mélanges de viande de poulet et de dinde ont été réalisés en différentes proportions (0%, 10%, 25%, 50% et 100% en dinde). L'ADN génomique de ces mélanges a été extrait pour ensuite le soumettre à l'analyse par PCR-RFLP.

Il ressort de l'analyse que la détection de la viande de dinde dans ces conditions est malaisée. Elle est indétectable à une teneur de 10%, on la discerne à 25% et si, à 50% sa présence est visible, elle est cependant largement supplantée par le signal du poulet (Photo 1). Pourtant, sur la viande de dinde seule, le système PCR-RFLP s'adressant à un segment du gène du cytochrome *b* fonctionne bien. Il semble donc y avoir une nette préférence des amorces pour le poulet plutôt que pour la dinde. Ce phénomène a aussi été constaté par Behrens *et al.* (1999).



**Photo 1:** Analyse par PCR-RFLP de mélanges de viandes fraîches de poulet et de dinde en proportions déterminées. La PCR a été effectuée au moyen des amorces CBM1/CBM2 devant produire un segment de 359 bp. La digestion des produits d'amplification est réalisée par l'enzyme de restriction *RsaI*. Pistes: 1) 100% poulet, 2) 10% dinde, 90% poulet, 3) 25% dinde, 75% poulet, 4) 50% dinde, 50% poulet, 5) 100% dinde, 6) Marqueur de poids moléculaire: échelle de 100 bp. Fragments attendus pour le poulet: 210 et 149 bp; fragments attendus pour la dinde: 149 bp et un doublet de 101 et 109 bp.

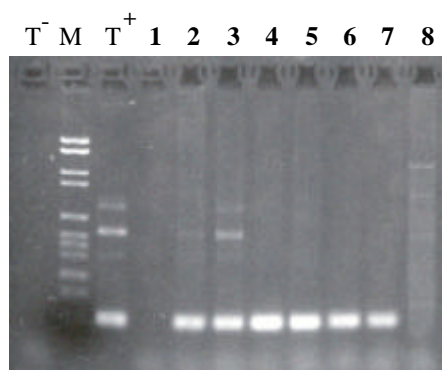
On peut conclure de ces résultats d'analyse que vouloir déceler la présence de viandes d'espèces données dans des préparations au moyen d'amorces universelles n'est pas possible en raison de cette préférence que peuvent manifester les amorces pour l'une ou l'autre des espèces constitutives d'un mélange.

### 2.3.2.4 Identification de l'espèce animale par amplification de cibles univoques

De nouveaux essais d'identification spécifique ont été entamés au moyen d'une trousse de la firme Alcum (Rietberg-Neuenkirchen, Allemagne). Il s'agit de mettre en évidence par PCR des segments que la firme a identifiés comme reliés chacun de façon univoque à la présence d'une espèce animale déterminée. Les essais ont été menés avec les trousse pour poulet, dinde, bœuf et porc. Il s'agit de la version des trousse prévue pour de la viande transformée car les cibles recherchées sont de petite taille (environ 146-182 bp) et relèvent, en principe, de l'ADN mitochondrial (les séquences des amorces ne sont pas précisées par la firme Alcum mais l'un de leur responsable, M. BEHRENS, a reconnu lors d'un entretien téléphonique qu'il s'agissait essentiellement de cibles mitochondriales) ce qu'entretemps nous avons pu confirmer par le clonage et le séquençage des segments (cf. annexe 7).

Ces trousse ont été utilisées sur de l'ADN extrait de tissus frais (morceaux de viande achetés en boucherie) constitué par du muscle de chacune des quatre espèces animales citées. Hormis l'existence de quelques bandes aspécifiques qu'il est possible faire disparaître en grande partie par une adaptation des conditions de PCR (hybridation de courte durée, température d'hybridation plus élevée), la trousse fournit de bons résultats sur tissus frais. Il subsiste un problème d'aspécificité qui doit encore être analysé car la trousse pour le bœuf répond également au porc (trois essais indépendants en prenant la précaution lors du troisième essai de se situer au cœur du muscle pour éviter une contamination, par du sang d'une autre espèce, qui aurait eu lieu en boucherie).

Le recours à des cibles univoques plutôt qu'universelles permet cette fois d'analyser sans difficulté un mélange de viande poulet/dinde avec une capacité de détection qui descend certainement jusqu'à 0,1% d'un constituant dans le mélange (cfr. Photo 2).



**Photo 2:** Recherche de la présence de dinde dans des mélanges en proportions déterminées de viande fraîche de poulet et de dinde. La recherche s'effectue sur l'ADN extrait du mélange en pistant la cible univoque pour la dinde. Pistes: T-: témoin négatif eau (= no template control) M: Marqueur de poids moléculaire, T+: témoin positif (ADN génomique certifié de dinde), 1 témoin négatif d'extraction, 2 à 8 : mélange poulet/dinde dans des proportions déterminées en poids frais de viande: (2): 90/10%, (3): 95/5%, (4): 97,5/2,5%, (5) 99/1%, (6): 99,5/0,5%, (7): 99,9/0,1%, (8) 100/0%



### 2.3.3 Recherche de déterminants moléculaires permettant de caractériser des souches de poulet à croissance lente

Pour arriver à trouver des déterminants moléculaires typiques de poulets à croissance lente, il faut arriver à déceler des polymorphismes corrélés à la vitesse de croissance au sein d'empreintes génétiques obtenues par l'une ou l'autre technique de criblage du génome. Les possibilités techniques pour produire de telles empreintes sont nombreuses: PCR-RFLP, RAPD, AFLP, microsatellites, ...

La voie principale que nous avons utilisée est la technique de l'AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) décrite par Vos *et al.* (1995) et dont le protocole complet est exposé en annexe n°4. Ce choix est fondé sur le fait qu'elle ne requiert aucune connaissance préalable du génome à analyser, tout en étant bien reproductible quel que soit l'appareillage utilisé (ce qui n'est pas le cas de la RAPD). Toutefois, l'inconvénient de l'AFLP est de ne pas permettre d'orienter les recherches vers un objectif précis, dans notre cas un polymorphisme lié à la vitesse de croissance. La découverte d'un polymorphisme valable est en définitive un événement purement fortuit car résultant d'une démarche par tâtonnements avec de multiples combinaisons d'amorces qu'aucune logique ne peut sous-tendre.

C'est pour cette raison, que parallèlement à l'AFLP, deux autres pistes de recherches ont été explorées. Il apparaît en effet, d'après des données de la littérature, que le gène de l'hormone de croissance ou d'autres éléments génétiques en rapport avec cette hormone sont souvent impliqués dans des mécanismes induisant des différences de vitesse de croissance. Nous avons dès lors focalisé certaines techniques de criblage sur de tels gènes par une technique de PCR ancrée et par de la PCR-RFLP mais qui, contrairement à l'AFLP, n'ont livré aucun résultat probant.

#### 2.3.3.1 Résultats obtenus au moyen de l'AFLP

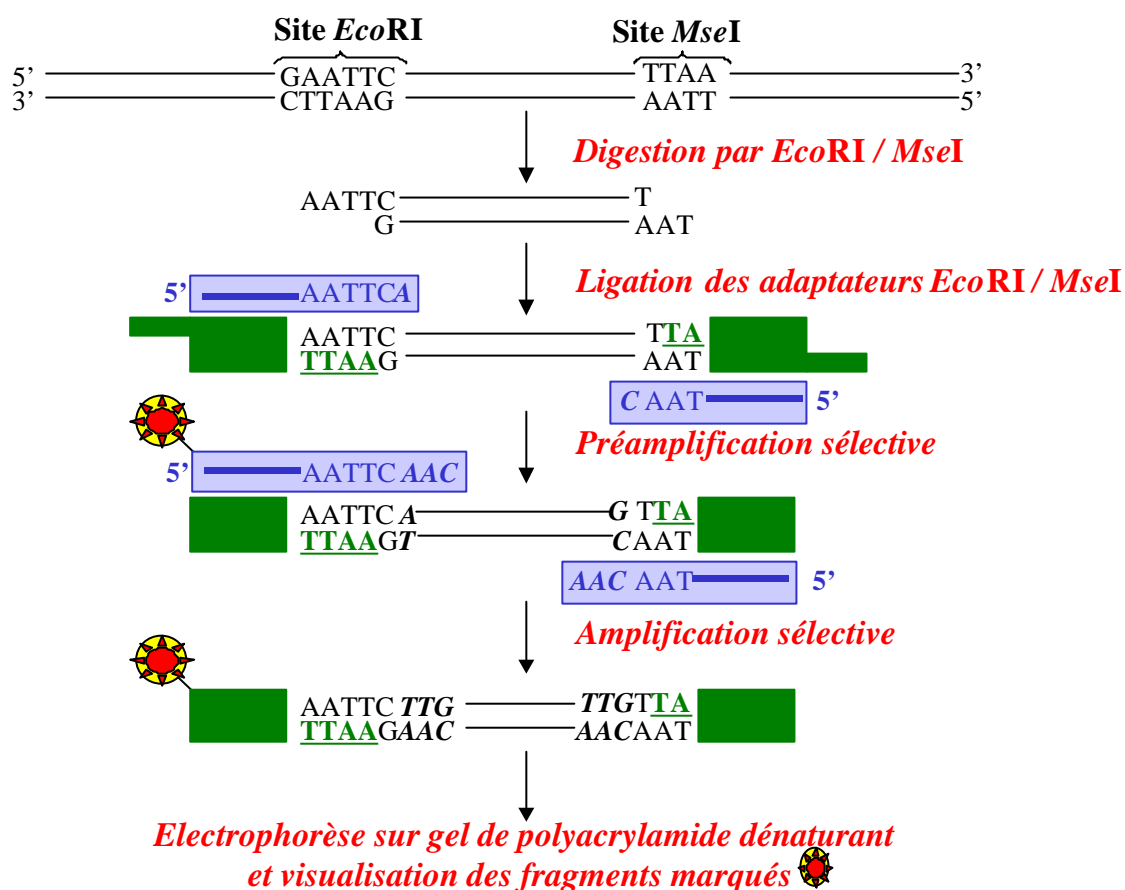
##### 2.3.3.1.1. L'AFLP, technique d'empreintes génétiques

La technique de l'AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism ou Polymorphisme de Longueur de Fragment Amplifié) est basée sur l'amplification sélective par PCR (Polymerase Chain Reaction) de fragments de restriction provenant de la digestion complète d'ADN génomique (Vos *et al.*, 1995).

Le principe général est décrit à la Figure 2. Il comprend quatre étapes :

1. La digestion totale de l'ADN génomique par deux enzymes de restriction simultanément.  
Cette étape génère des fragments d'ADN nécessaires aux étapes suivantes de ligation et d'amplification d'ADN. Les fragments de restriction sont générés par l'emploi de deux enzymes : l'une coupant rarement (par exemple : *EcoRI*), l'autre coupant plus fréquemment (par exemple : *MseI*).
2. La ligation des adaptateurs.  
Aux fragments issus de la digestion sont ajoutés par ligation des adaptateurs à bouts cohésifs complémentaires des sites de restriction.

3. Ces adaptateurs servent de site de liaison à des oligonucléotides de séquence homologue à celle de l'adaptateur et prolongée de une à trois bases choisies arbitrairement. Seuls certains fragments pourront ainsi être amplifiés lors de l'étape d'amplification par PCR. En outre, l'amorce capable de se lier à l'adaptateur du site le moins courant est marquée (soit radioactivement, soit par un fluorochrome).
4. Les fragments amplifiés peuvent alors être analysés par électrophorèse en gel de polyacrylamide où seuls les fragments marqués seront visualisés (les fragments *MseI-MseI* demeurent donc indétectables).



**Figure 2 :** Principe de l'AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism).

#### 2.3.3.1.2. Acquisition des empreintes génétiques obtenues par AFLP

Jusqu'en septembre 1999, la détection des fragments amplifiés par PCR était obtenue grâce au marquage radioactif ( $P^{33}$ ) d'un des oligonucléotides. Le gel de polyacrylamide était, après électrophorèse, séché et mis en présence d'une émulsion photographique. La durée d'exposition requise avant de développer le film pouvait, selon la fraîcheur du radio-isotope, aller jusqu'à dix jours.

Depuis, le Département Qualité des Productions Agricoles a acquis un séquenceur automatique GENE READER™ DNA ANALYSIS SYSTEM L4200S-1 (LI-COR INC.,

LINCOLN, NE, USA). Cet appareil permet de réaliser des électrophorèses sur des gels de polyacrylamide de 18, 25 ou 41 cm. Il est adapté à l'analyse de fragments (RFLP, RAPD, AFLP, micro ou minisatellites) ainsi qu'au séquençage.

Les fragments à analyser sont marqués au moyen d'un fluorochrome. La détection des fragments est obtenue par excitation du fluorochrome au moyen d'un rayon laser et l'émission d'un rayonnement par le fluorochrome à une longueur d'onde de 807 nm.

Les avantages d'un tel appareil sont l'abandon de la radioactivité comme système de détection (plus grande sécurité), la visualisation des résultats en cours d'électrophorèse ("on-line") et la possibilité d'obtenir en une seule fois les empreintes génétiques sur une plus large gamme de poids moléculaire. Ces deux derniers avantages permettent un gain de temps considérable qui a encore pu être accru par le fait que nous avons pu éprouver qu'un même gel peut servir pour trois migrations successives.



**Photo 3** : Séquenceur automatique GENE READIR™ DNA ANALYSIS SYSTEM L4200S-1 utilisé pour l'analyse d'empreintes génétiques de poulet.

#### 2.3.3.1.3. Paramètres étudiés pour l'obtention de profils AFLP stables et reproductibles

Le passage au séquenceur automatique nous a conduit à tester certains paramètres de la technique. Les empreintes obtenues avec ce nouvel équipement se caractérisaient en effet par un bruit de fond sensiblement plus important et, sur certains gels, par des bandes moins nettes (phénomène appelé « Blob effect »).

Les paramètres envisagés ont été :

- pour l'étape d'extraction des ADN
  - différentes méthodes d'extraction ont été testées, en particulier des techniques livrant de l'ADN plus pur que la méthode au phénol-chloroforme
    - ✓ Méthode au phénol – chloroforme
    - ✓ Kit Wizard ADN génomique de Promega
    - ✓ Kit Wizard Clean Up de Promega
    - ✓ Kit Alcum
    - ✓ Kit Dneasy de QIagen
  - la qualité des ADN obtenus par ces différentes méthodes (absence de dégradation) a été vérifiée sur gel
- pour l'étape de la digestion des ADN
  - 2 quantités d'enzymes ont été testées
- pour l'étape de ligation des adaptateurs
  - la durée et la température de la ligation ( par ex. : 2 heures à 20 °C, une nuit à 14 °C)
- pour l'étape d'amplification par PCR
  - Plusieurs marques d'enzymes *Taq* DNA polymérase ont été testées
    - ✓ Roche Diagnostics
    - ✓ Amersham-Pharmacia Biotech
    - ✓ Platinum de Life Technologies (c'est-à-dire une enzyme à "hot start" automatique)
  - Le programme d'amplification présente un incrément de température  
L'utilité de cet incrément a été vérifiée.

La conclusion de ces différents essais est que les conditions d'origine conduisent à l'obtention d'empreintes présentant une bonne répétabilité et un bruit de fond minimum. L'élément le plus critique est la qualité suffisante de l'ADN génomique extrait. Lorsque ce dernier est trop dégradé ("smear" de dégradation nettement visible sur gel d'agarose) des profils AFLP aberrants peuvent être générés. Quant à la technique d'extraction aucune différence n'a pu être observée sur la qualité des empreintes lorsque des techniques autres que le phénol-chloroforme sont utilisées.

#### 2.3.3.1.4. Mise en évidence de bandes spécifiques des souches à croissance lente ou rapide

Dans un premier temps, 64 combinaisons de paires d'amorces ont été éprouvées en travaillant avec un système de restriction *EcoRI/MseI* classique en AFLP. Deux poulets, un poulet à croissance lente et un poulet à croissance rapide (ou "poulet industriel") ont fourni le matériel pour ces analyses. Le tableau 2 reprend le nombre de

différences observées entre le profil "poulet à croissance lente" et le profil "poulet à croissance rapide" pour chaque combinaison d'amorces.

Par soucis de concision, la dénomination des amorces a été abrégée. Les amorces utilisées lors de l'amplification sélective sont constituées d'une partie constante permettant une hybridation à sa séquence complémentaire (séquence des adaptateurs) et d'une partie variable constituée de un à trois nucléotides sélectifs (permettant de n'amplifier que les fragments possédant les nucléotides complémentaires).

Les amorces utilisées ont donc été baptisées de l'initiale de l'enzyme de restriction auquel elles correspondent (E pour *EcoRI* ; M pour *MseI*) complétée par l'initiale des nucléotides sélectifs (N). Soit :



**Tableau 2** : Nombre de polymorphismes observés entre un poulet à croissance lente et un poulet à croissance rapide pour 64 combinaisons d'amorces en AFLP utilisant du matériel génomique restreint par *EcoRI* et *MseI*.

Amorces <i>EcoRI</i>	Amorces <i>MseI</i>							
	M-CAA	M-CAC	M-CAG	M-CAT	M-CTA	M-CTC	M-CTG	M-CTT
E-AAC	9	7	5	7	7	10	3	3
E-AAG	8	13	5	18	12	10	7	8
E-ACA	10	9	11	9	8	12	7	9
E-ACC	9	4	0	6	7	8	10	5
E-ACG	3	10	1	4	5	3	5	6
E-ACT	4	8	6	6	6	3	8	10
E-AGC	6	4	8	6	12	2	4	5
E-AGG	7	11	11	14	10	6	6	10

Aucune des combinaisons d'amorces n'est à rejeter au vu des profils obtenus. Il faut toutefois remarquer que l'usage des amorces E-ACG entraîne des profils nettement moins fournis en bandes. La combinaison de cette dernière amorce avec une amorce M-CA (moins sélective) accroît évidemment le nombre total de bandes du profil mais s'avère sans répercussion sur le nombre de polymorphismes observables entre poulets à croissance lente (30 sujets testés) et à croissance rapide (9 sujets testés) car les quelques différences constatées relèvent de la variabilité génétique individuelle.

Il semble bien que les souches à croissance lente que nous étudions soient issues de croisements impliquant des races à croissance lente et des races à croissance rapide. Ces dernières jouent un rôle important au niveau de la conformation des animaux (informations émanant de Monsieur Leplat de l'ex-OPPEW - Office de Promotion des Petits Elevages en Wallonie). Pour cette raison, nous avons intégré dans la suite des analyses trois individus à croissance très lente (de la race reconstituée l'Ardennaise) obtenus auprès de Monsieur Bernard de la Ferme de Penteville (Gembloux).

Grâce au séquenceur automatique nous permettant d'analyser plus rapidement un nombre d'individus important, nous avons décidé de retester les 64 combinaisons

d'amorces décrites dans le Tableau 2 sur un échantillon d'individus plus large. Trois amorces *EcoRI* et une amorce *MseI* ont été ajoutées ; il s'agit de : E-AAA, E-AAT, E-ATA et M-CCA. Soit 99 combinaisons d'amorces à tester.

Par ailleurs, il semblerait que la combinaison d'enzymes de restriction *EcoRI/TaqI* soit préférable dans le cas des mammifères et des oiseaux en général et du poulet en particulier (Knorr *et al.*, 1999). Deux amorces *TaqI* ont également été envisagées soit 22 combinaisons testées sur de l'ADN génomique restreint par les enzymes *EcoRI* et *TaqI*.

De la même manière que pour les amorces *EcoRI* et *MseI*, nous avons abrégé les noms des amorces *TaqI*.



**Tableau 3 :** 22 combinaisons d'amorces en AFLP à tester utilisant du matériel génomique restreint par *EcoRI* et *TaqI*.

E-AAA x T-ATG	E-AAA x T-CT
E-AAC x T-ATG	E-AAC x T-CT
E-AAG x T-ATG	E-AAG x T-CT
E-AAT x T-ATG	E-AAT x T-CT
E-ACA x T-ATG	E-ACA x T-CT
E-ACC x T-ATG	E-ACC x T-CT
E-ACG x T-ATG	E-ACG x T-CT
E-ACT x T-ATG	E-ACT x T-CT
E-AGC x T-ATG	E-AGC x T-CT
E-AGG x T-ATG	E-AGG x T-CT
E-ATA x T-ATG	E-ATA x T-CT

Au total, il s'agit de 121 combinaisons d'amorces qui ont été testées sur 21 poulets (3 poulets à croissance très lente, 9 poulets à croissance lente et 9 poulets à croissance rapide).

Pour certaines combinaisons d'amorces, des tendances se dessinent telle la fréquence plus grande de l'une ou l'autre bande de taille déterminée au sein d'un des groupes de poulets. Vu le grand nombre de combinaisons testées, certaines bandes ont été trouvées de manière exclusive dans l'un des groupes de poulets. Dans ce dernier cas, les combinaisons d'amorces intéressantes (au nombre de cinq) ont été testées sur un échantillonnage d'individus encore plus étendu.

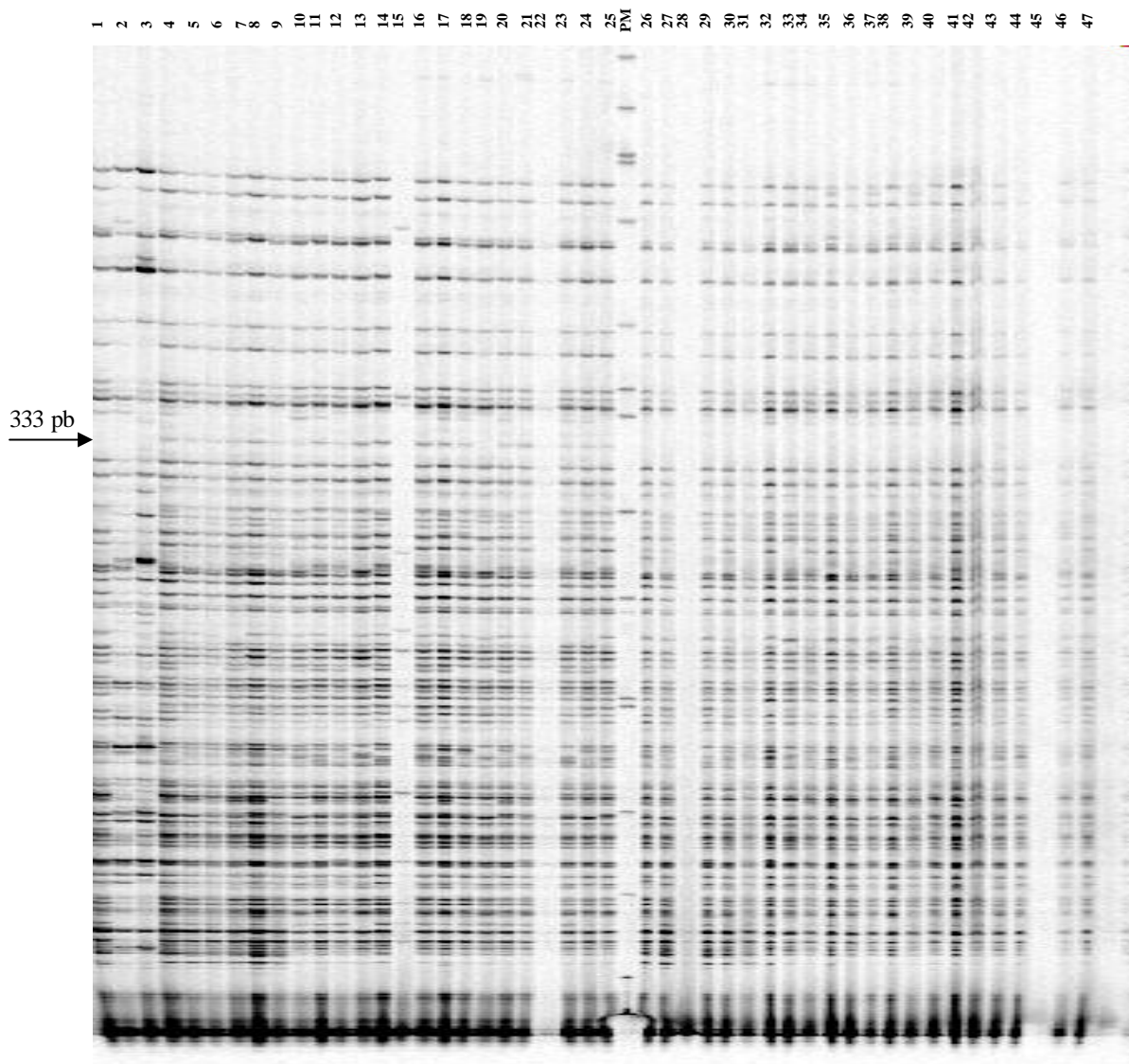
Les cinq combinaisons d'amorces retenues sont : E-AAC/T-ATG, E-AAA/M-CAA, E-AAC/M-CAA, E-ACC/M-CAG et E-AAA/M-CAT. Elles ont été testées sur un autre set de 61 poulets (2 poulets à croissance très lente, 26 poulets à croissance lente et 33 poulets à croissance rapide).

Finalement, seules deux combinaisons d'amorces (E-AAC/T-ATG et E-AAC/M-CAA) permettent d'identifier deux bandes spécifiques de l'un des groupes de poulets. La combinaison E-AAC/T-ATG permet de mettre en évidence une bande de

372 pb caractéristique des poulets issus de souches à croissance rapide ; la combinaison E-AAC/M-CAA fournit un profil présentant une bande de 333 pb spécifique des poulets issus de souches à croissance lente.

La figure 3 a et b présente les profils AFLP obtenus avec la combinaison d'amorces E-AAC/M-CAA.





**Légende :**

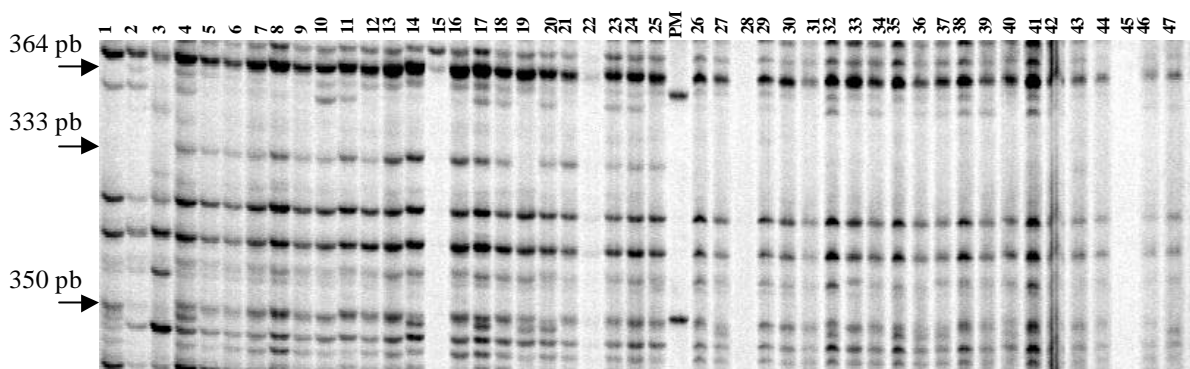
- |                                     |                                     |                    |
|-------------------------------------|-------------------------------------|--------------------|
| <b>1.</b> Ardennaise 01             | <b>18.</b> CrL 17 - Poulet Villages | <b>34.</b> Ind 10  |
| <b>2.</b> Ardennaise 02             | <b>19.</b> Cert 01                  | <b>35.</b> Ind 11  |
| <b>3.</b> Ardennaise 03             | <b>20.</b> CrL 19 - Poulet Villages | <b>36.</b> Ind 12  |
| <b>4.</b> CrL 02 - Label Rouge      | <b>21.</b> CrL 20 - Poulet Villages | <b>37.</b> Ind 13  |
| <b>5.</b> CrL 03 - Poulet Villages  | <b>22.</b> CrL 21 - Poulet Villages | <b>38.</b> Cert 06 |
| <b>6.</b> CrL 04 - Poulet Villages  | <b>23.</b> CrL 22 - Poulet Villages | <b>39.</b> Cert 07 |
| <b>7.</b> CrL 05 - Poulet Villages  | <b>24.</b> CrL 23 - Poulet Villages | <b>40.</b> Ind 16  |
| <b>8.</b> CrL 06 - Poulet Villages  | <b>25.</b> CrL 24 - Poulet Villages | <b>41.</b> Ind 17  |
| <b>9.</b> CrL 07 - Poulet Villages  | <b>PM.</b> Poids moléculaire        | <b>42.</b> Ind 18  |
| <b>10.</b> CrL 08 - Poulet Villages | <b>26.</b> Ind 02                   | <b>43.</b> Ind 19  |
| <b>11.</b> CrL 09 - Poulet Villages | <b>27.</b> Ind 03                   | <b>44.</b> Ind 20  |
| <b>12.</b> CrL 10 - Poulet Villages | <b>28.</b> Ind 04                   | <b>45.</b> Ind 21  |
| <b>13.</b> CrL 11 - Poulet Villages | <b>29.</b> Ind 05                   | <b>46.</b> Ind 22  |
| <b>14.</b> CrL 12 - Poulet Villages | <b>30.</b> Ind 06                   | <b>47.</b> Ind 23  |
| <b>15.</b> CrL 14 - Poulet Villages | <b>31.</b> Ind 07                   |                    |
| <b>16.</b> CrL 15 - Poulet Villages | <b>32.</b> Ind 08                   |                    |
| <b>17.</b> CrL 16 - Poulet Villages | <b>33.</b> Ind 09                   |                    |

**Poids moléculaire :**

- 565 pb
- 530 pb
- 500 pb
- 495 pb
- 460 pb
- 400 pb
- 364 pb
- 350 pb
- 300 pb
- 255 pb
- 204 pb
- 200 pb
- 145 pb
- 100 pb
- 50 pb

**Figure 3a :** Profils AFLP obtenus avec la combinaison d’amorces sélectives E-AAC/M-CAA



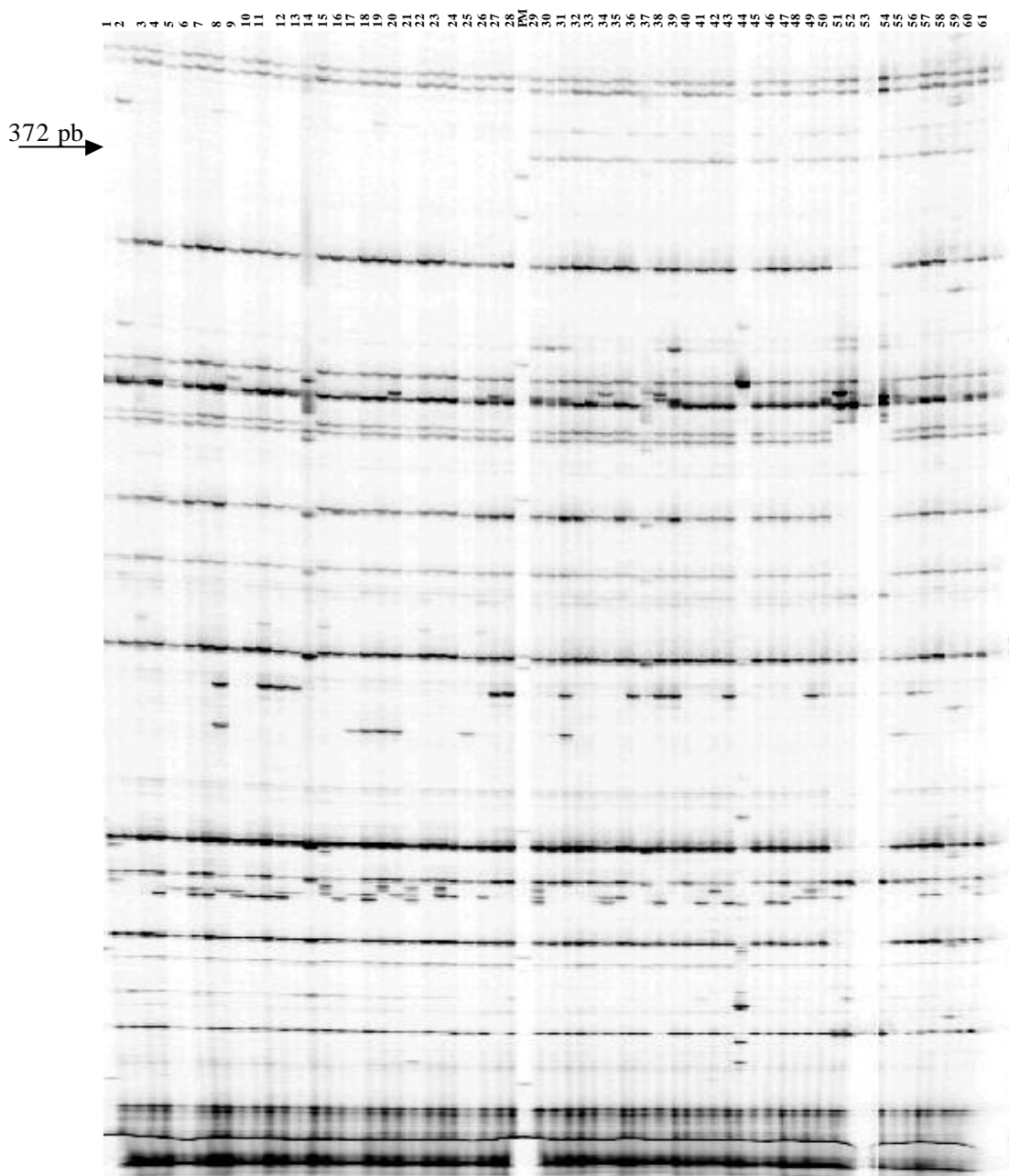


**Légende :**

- |                                     |                                     |                    |
|-------------------------------------|-------------------------------------|--------------------|
| <b>1.</b> Ardennaise 01             | <b>17.</b> CrL 15 - Poulet Villages | <b>32.</b> Ind 08  |
| <b>2.</b> Ardennaise 02             | <b>18.</b> CrL 16 - Poulet Villages | <b>33.</b> Ind 09  |
| <b>3.</b> Ardennaise 03             | <b>19.</b> Cert 01                  | <b>34.</b> Ind 10  |
| <b>4.</b> CrL 02 - Label Rouge      | <b>20.</b> CrL 19 - Poulet Villages | <b>35.</b> Ind 11  |
| <b>5.</b> CrL 03 - Poulet Villages  | <b>21.</b> CrL 20 - Poulet Villages | <b>36.</b> Ind 12  |
| <b>6.</b> CrL 04 - Poulet Villages  | <b>22.</b> CrL 21 - Poulet Villages | <b>37.</b> Ind 13  |
| <b>7.</b> CrL 05 - Poulet Villages  | <b>23.</b> CrL 22 - Poulet Villages | <b>38.</b> Cert 06 |
| <b>8.</b> CrL 06 - Poulet Villages  | <b>24.</b> CrL 23 - Poulet Villages | <b>39.</b> Cert 07 |
| <b>9.</b> CrL 07 - Poulet Villages  | <b>25.</b> CrL 24 - Poulet Villages | <b>40.</b> Ind 16  |
| <b>10.</b> CrL 08 - Poulet Villages | Marqueur de poids moléculaire       | <b>41.</b> Ind 17  |
| <b>11.</b> CrL 09 - Poulet Villages | <b>26.</b> Ind 02                   | <b>42.</b> Ind 18  |
| <b>12.</b> CrL 10 - Poulet Villages | <b>27.</b> Ind 03                   | <b>43.</b> Ind 19  |
| <b>13.</b> CrL 11 - Poulet Villages | <b>28.</b> Ind 04                   | <b>44.</b> Ind 20  |
| <b>14.</b> CrL 12 - Poulet Villages | <b>29.</b> Ind 05                   | <b>45.</b> Ind 21  |
| <b>15.</b> CrL 13 - Poulet Villages | <b>30.</b> Ind 06                   | <b>46.</b> Ind 22  |
| <b>16.</b> CrL 14 - Poulet Villages | <b>31.</b> Ind 07                   | <b>47.</b> Ind 23  |

**Figure 3b :** Région du gel contenant la bande spécifique des poulets issus de souches à croissance lente (333 pb)

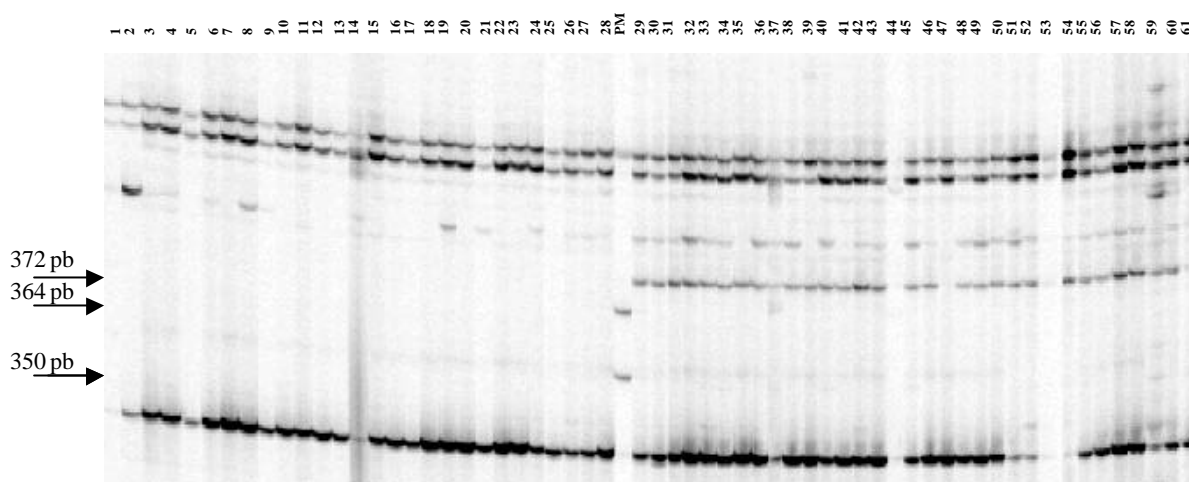
L'allure générale des profils obtenus est relativement constante d'un poulet à l'autre. Des différences individuelles sont cependant visibles (présence ou absence de l'une ou l'autre bande). Une bande nette est aisément observable dans les puits 4 à 25 occupés par des poulets à croissance lente (CrL). Le puits 15 montre un profil nettement différent de celui obtenu avec les autres individus. Il est probablement dû à un ADN de mauvaise qualité. Au niveau du puits 19, aucune bande n'est présente à la taille attendue. Il s'agit du profil obtenu avec l'ADN d'un poulet faisant l'objet d'une certification alimentaire mais qui n'est pas issu d'une souche à croissance lente. Remarquons enfin qu'aucun des individus de la race reconstituée 'L'Ardennaise' à croissance très lente ne présente la bande de 333 pb.



**Légende :**

- |                              |                              |            |                          |
|------------------------------|------------------------------|------------|--------------------------|
| 1. Ardennaise 01             | 19. CrL 56 - Poulet Villages | 36. Ind 28 | 54. Ind 46               |
| 2. Ardennaise 04             | 20. CrL 57 - Poulet Villages | 37. Ind 29 | 55. Cert 01              |
| 3. CrL 14 - Poulet Villages  | 21. CrL 42                   | 38. Ind 30 | 56. Cert 02              |
| 4. CrL 15 - Poulet Villages  | 22. CrL 43 - Label Rouge     | 39. Ind 31 | 57. Cert 06              |
| 5. CrL 16 - Poulet Villages  | 23. CrL 49 - Label Rouge     | 40. Ind 32 | 58. Cert 07              |
| 6. CrL 21 - Poulet Villages  | 24. CrL 50 - Agri. Bio.      | 41. Ind 33 | 59. Cert 08              |
| 7. CrL 25 - Poulet Villages  | 25. CrL 51 - Agri. Bio.      | 42. Ind 34 | 60. Cert 09              |
| 8. CrL 26 - Poulet Villages  | 26. CrL 54 - Label Rouge     | 43. Ind 35 | 61. Cert 10              |
| 9. CrL 28 - Poulet Villages  | 27. CrL 58 - Label Rouge     | 44. Ind 36 | <b>Poids moléculaire</b> |
| 10. CrL 29 - Poulet Villages | 28. CrL 59 - Agri. Bio.      | 45. Ind 37 | 364 pb                   |
| 11. CrL 30 - Poulet Villages | 29. Ind 02                   | 46. Ind 38 | 350 pb                   |
| 12. CrL 31 - Poulet Villages | 30. Ind 05                   | 47. Ind 39 | 300 pb                   |
| 13. CrL 32 - Poulet Villages | 31. Ind 08                   | 48. Ind 40 | 255 pb                   |
| 14. CrL 33 - Poulet Villages | 32. Ind 24                   | 49. Ind 41 | 204 pb                   |
| 15. CrL 37 - Poulet Villages | 33. Ind 25                   | 50. Ind 42 | 200 pb                   |
| 16. CrL 38 - Poulet Villages | 34. Ind 26                   | 51. Ind 43 | 145 pb                   |
| 17. CrL 39 - Poulet Villages | 35. Ind 27                   | 52. Ind 44 | 100 pb                   |
| 18. CrL 40 - Poulet Villages |                              | 53. Ind 45 | 50 pb                    |

**Figure 4a :** Profils AFLP obtenus avec la combinaison d’amorces sélectives E-AAC/T-ATG



**Figure 4b :** Région du gel contenant la bande spécifique des poulets issus de souches à croissance rapide (372 pb)

Les profils AFLP observés avec la combinaison d’amorces sélectives E-AAC/T-ATG se caractérisent par un nombre de bandes nettement moins important qu’avec la combinaison E-AAC/M-CAA. Sur ce gel, le poulet Ind 36 (puits 44) montre également un profil aberrant. Une bande située à 372 pb est bien visible chez les poulets à croissance rapide (Ind).

Ces résultats ont été confirmés sur l’ensemble des individus à notre disposition (157 poulets). Sur cette population, la bande de 372 pb caractéristique des poulets à croissance rapide a été détectée chez les poulets « industriels » provenant de systèmes de production intensive. La bande associée au critère croissance lente est retrouvée systématiquement chez les 34 individus de la souche JA (Poulets Villages – Label de Qualité Wallon) et n’est absente que chez 2 individus (certifiés par le Label Rouge) sur 74. Il est à signaler également qu’aucun individu ne présente simultanément les deux bandes. Pour les deux poulets Label Rouge « atypiques », la bande spécifique de l’autre groupe a été observée. A ce stade, il est prématuré de conclure si l’on est confronté au cas particulier d’une souche à croissance lente présentant le(s) profil(s) moléculaire(s) d’une souche à croissance rapide ou si l’il s’agit d’une fraude volontaire ou non.

#### 2.3.3.1.5. Caractérisation des deux déterminants moléculaires spécifiques du type de souches

Les marqueurs que nous avons identifiés sont apparemment corrélés à la vitesse de croissance. Ils pourraient toutefois ne refléter qu’une liaison stable avec une race particulière utilisée lors des croisements pour obtenir les souches soit à croissance rapide, soit à croissance lente. Afin d’appréhender la signification exacte de ces deux déterminants, nous les avons isolés, clonés et séquencés.

Chacune des deux bandes intéressantes a été isolée chez 4 individus. Pour la bande caractéristique des poulets à croissance rapide, les poulets I<sub>2</sub>, I<sub>8</sub>, I<sub>24</sub> et I<sub>27</sub> ont été choisis. Pour l’autre bande, spécifique des poulets à croissance lente, les poulets Villages F<sub>30</sub>, F<sub>33</sub>, F<sub>37</sub> et F<sub>38</sub> ont été retenus.

Les deux fragments récupérés ont ensuite été clonés en utilisant le TA CLONING KIT de INVITROGEN.

Amorce sélective E-AAC

1 gactgcgctac caattcaaca cacatggcaa attgccaag ccatccagat 50

51 tcttgcgagt gttataaca aaatgggagg gttctttctg cagcatacag 100

101 ggtaaggagt aattcctggc agaagtgagt acagccattg aaagtagaca 150

151 tgtgttgttt ctctttatat agttcagatg aagcaaatgc attctgttct 200

201 tattccagga ttgacagaaa cttggttcat gagtgtagta ccttccttag 250

251 aaatgatgat ctactgtgtc acttgcttta cataactaat actgtttaca 300

301 attttgcttt gtgtttgtta ctcaggactc atc 333

Amorce sélective M-CAA

**Figure 5 :** Séquence du fragment d'ADN caractéristique des poulets issus de souches à croissance lente

Amorce sélective T-ATG

1 gatgagtcct gagcgaatgt catcactctc tcggtggcag tctctgtttg 50

51 ctgtgtatgt ataacatgct ttaacagag ggccatagct tagaaaaagg 100

101 tattaacag ctaggttgct gaaagactga aggtgggcgt tcatctccag 150

151 caaggttaga aaattgaatc tgcgaactt gctttgagat gctgtaaaag 200

201 tgagtcattt gctcatgaaa actctgaatg accgctttgt ttttgggtag 250

251 ttatccctct tttccagttt attccacgtc atataaaaac cgtatgcaaa 300

301 tgtcctgact gaagtgaaat gttctttgat cccaagctat gaaattcatt 350

351 actgttgaaat tggtacgcag tc 372

Amorce sélective E-AAC

**Figure 6 :** Séquence du fragment d'ADN caractéristique des poulets issus de souches à croissance rapide

Les séquences des deux fragments mis en évidence ont été comparées aux séquences actuellement répertoriées dans les banques internationales. Aucune homologie n'a pu être établie. Il est donc impossible de vérifier que les marqueurs identifiés sont effectivement apparentés à des gènes impliqués dans la croissance. 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 (par exemple : valorisation limitée aux souches produites à partir de races particulières).

### 2.3.3.2 Résultats obtenus au moyen de la PCR ancrée

Un format particulier de PCR, la PCR ancrée ("anchored PCR"), a été réalisé pour essayer de mettre en évidence des différences entre les deux groupes de poulets. Il s'agit d'une réaction d'amplification qui, à maints égards, ressemble à de l'AFLP mais s'en distingue par le fait qu'il y a moyen de rechercher des cibles bien spécifiques dans la mesure où celles-ci sont reconnues par une des amorces du mélange réactionnel, amorce qui est marquée comme en AFLP.

Dans notre cas, l'amorce en question, dénommée GHA, a été ciblée sur un élément du promoteur du gène de l'hormone de croissance du poulet. Il s'agit plus exactement de la région supposée de liaison du facteur de régulation (GHF-1/Pit1) de l'hormone de croissance (Tanaka *et al.*, 1992). Il y a fort à parier que cet élément du promoteur se retrouve, de façon plus ou moins bien conservée, dans des promoteurs d'autres gènes ayant, de près ou de loin, un rapport avec la croissance. Aussi peut-on s'attendre à obtenir un profil constitué de plusieurs bandes pouvant varier en taille selon les poulets.

La réaction d'amplification s'opère, comme pour l'AFLP, après restriction totale du matériel génomique. Une seule enzyme aurait probablement pu suffire mais nous avons repris ici les conditions de l'AFLP tant pour la restriction par le couple *EcoRI/MseI* que pour les étapes de liaison aux adaptateurs. Suivent ensuite des étapes d'amplification par PCR faisant intervenir l'amorce GHA et des amorces non sélectives capables de se lier aux adaptateurs ligés aux extrémités *EcoRI* ou *MseI* des fragments génomiques. Dans la dernière étape de PCR, l'amorce GHA est marquée radioactivement et donc seuls les fragments intégrant cette amorce sont visibles.

La réaction semble particulièrement sensible à la température d'hybridation des cycles. Lorsque la température est trop élevée (65°C) il n'y a plus aucun signal. A des températures plus basses (60-62,5°C), on obtient une empreinte génétique avec une multiplicité de bandes nettement plus importante que ce que l'on attendait. Un résultat similaire, bien qu'ayant un profil différent, est obtenu avec le complément de l'amorce GHA (amorce AHG). A quelques détails près, les profils obtenus avec ces amorces GHA et AHG sont cependant identiques pour tous les poulets qu'ils soient fermiers ou industriels. Enfin il est à noter que la transposition de ces essais sur le séquenceur automatique ne fournit aucun signal.

### 2.3.3.3 Résultats obtenus au moyen de la PCR-RFLP

L'intérêt, dans le cadre de nos recherches, d'un polymorphisme restrictionnel identifié récemment au sein d'un intron du gène du récepteur de l'hormone de croissance (Feng *et al.*, 1998) chez le poulet a été évalué. Il a en effet été observé dans l'étude précitée mettant en évidence ce polymorphisme qu'un site *HindIII* additionnel au sein de l'intron du gène était associé à la vitesse de croissance chez les poulets de souches dérivées de la race White Leghorn.

Les tests décrits par Feng *et al.* (1998) ont été répétés sur la série des poulets à notre disposition (16 poulets certifiés, 36 poulets industriels, 52 poulets fermiers). L'ADN extrait de ces poulets est soumis à une PCR amplifiant un segment de 730 bp de l'intron du gène du récepteur de l'hormone de croissance du poulet. Le produit amplifié est ensuite soumis à une restriction enzymatique par *HindIII*. Deux profils possibles sont attendus:

- un profil à trois bandes: 160, 250 et 320 bp (croissance rapide chez les souches dérivées de la race White Leghorn)
- un profil à deux bandes: 410 et 320 bp (croissance lente chez les souches dérivées de la la race White Leghorn).

Nous observons que la majorité des poulets analysés, et parmi eux tous les poulets fermiers testés, présentent le profil à trois bandes considéré comme associé à la croissance rapide chez les souches dérivées de la race White Leghorn. Seuls cinq profils à deux bandes ont été obtenus, d'une part chez un poulet certifié (qui est fort probablement un poulet à croissance rapide, la certification ne portant que sur l'alimentation) et d'autre part chez quatre poulets industriels.

Il est donc établi par ces résultats que ce polymorphisme restrictionnel n'est d'aucune utilité pour nos recherches même s'il présente un intérêt réel pour des souches dérivées de la race White Leghorn.

#### **2.3.4 Perspectives concernant l'authentification génétique**

Les résultats obtenus jusqu'à présent pour obtenir un déterminant moléculaire caractéristique de souches de poulet à croissance lente sont encourageants. Alors que toutes les possibilités de l'AFLP n'ont pas encore été épuisées, deux combinaisons d'amorces permettent la mise en évidence d'une bande spécifique des poulets à croissance lente (333 pb) dans un cas et d'une bande caractéristique des poulets à croissance rapide (372 pb) dans le second cas. Nous sommes relativement confiants quant à l'intérêt pratique que présentent les déterminants que nous avons mis en évidence car les comparaisons ont été réalisées sur un large échantillonnage de poulets disponibles dans le commerce (des souches purement industrielles et des souches à croissance lente authentifiées avec un intérêt particulier pour la souche commerciale JA). Toutefois, nous savons déjà que le déterminant caractéristique des souches à croissance lente que nous avons mis en évidence ne se retrouve pas chez la race reconstituée et à croissance très lente, l'Ardennaise. Il serait donc intéressant de vérifier précisément sur des spécimens parfaitement caractérisés génétiquement à quel point les deux déterminants que nous avons identifiés (un pour la croissance lente et l'autre pour la croissance rapide) sont précis.

Il est probablement impossible d'avoir un seul déterminant présent chez toutes les souches à croissance lente car l'origine génétique responsable de ce phénotype est très certainement multiple. Néanmoins, si des résultats contradictoires devaient être obtenus avec certaines races ou souches, les possibilités fournies par l'AFLP nous permettent de rechercher pour ces dernières de nouveaux déterminants qui leur sont spécifiques et d'élargir ainsi la collection des caractères moléculaires permettant d'établir si une souche est ou non à croissance lente.

Enfin, si l'AFLP nous a permis d'investiguer le polymorphisme de l'ADN sans avoir besoin de données précises quant à la génétique des poulets commercialisés (ces renseignements étant tenus secrets par les firmes de sélection et de reproduction), elle apparaît comme lourde à mettre en routine ; l'obtention des résultats nécessite au minimum deux jours. Sur base des résultats déjà obtenus (séquences de nos marqueurs moléculaires), un test d'amplification génique par PCR (Polymerase Chain Reaction) ne nécessitant préalablement qu'une extraction de l'ADN devrait pouvoir être développé. Les résultats pourraient ainsi être obtenus dans la journée, voire même plus rapidement.

## ***2.4 Authentification des découpes de poulet visant à distinguer les poulets de qualité certifiée des poulets ordinaires grâce à la SPIR***

Les résultats décrits ci-après ont fait l'objet d'une publication (Fumière *et al.*, 2000) dans " Journal of Near Infrared Spectroscopy ".

### ***2.4.1 Détermination du meilleur mode de présentation pour obtenir des spectres reproductibles et mesures des échantillons de viande***

L'analyse des échantillons de viande de poulet a été effectuée sur deux appareils : le **NIRSystems 6500** (FOSS-NIRSYSTEMS INC., Silver Spring, USA) et le **DA 7000 Perten** (PERTEN INSTRUMENTS INC., Chatham, USA).

Chacun des deux appareils possède des caractéristiques propres permettant un choix plus large du mode de mesure :

**NIRSystems 6500 :** Ce spectromètre dispose d'une gamme de longueurs d'ondes s'étendant de 400 à 2500 nm par pas de 2 nm. L'analyse des échantillons nécessite une homogénéisation préalable. Une large plage de mesures et une fine résolution sont les principaux avantages de cet appareil. Le NIR 6500 permet l'analyse journalière d'un grand nombre d'échantillons. Cet appareil a déjà été utilisé à de nombreuses reprises pour l'analyse de produits de viande.



**Photos 4 et 5** : Appareil NIRSystems 6500 en configuration DCA (Direct Contact Analysis) utilisé pour l'analyse d'échantillons de viande de poulet.

**DA 7000 Perten :** Ce spectromètre est capable réaliser 600 balayages par seconde et sa gamme de longueurs d'ondes s'étend de 400 à 1700 nm par pas de 5 nm. Il permet l'analyse d'échantillons sans préparation particulière (par exemple : des poulets entiers). Une très grande rapidité d'acquisition des spectres, un faible nombre de composantes optiques sont deux avantages non négligeables de ce type d'appareil. Le DA 7000, de par sa vitesse d'acquisition des spectres, convient bien pour une application industrielle. Notre département a utilisé cet appareil dans le cadre d'un projet du Ministère des Classes Moyennes et de l'Agriculture visant à mettre au point une méthode recourant à la spectrométrie proche infrarouge pour apprécier "en ligne" la qualité des pommes sur base des critères internes et d'effectuer leur tri de manière automatique.



**Photos 6 et 7 :** Appareil DA 7000 Perten lors de l'analyse d'une cuisse de poulet.

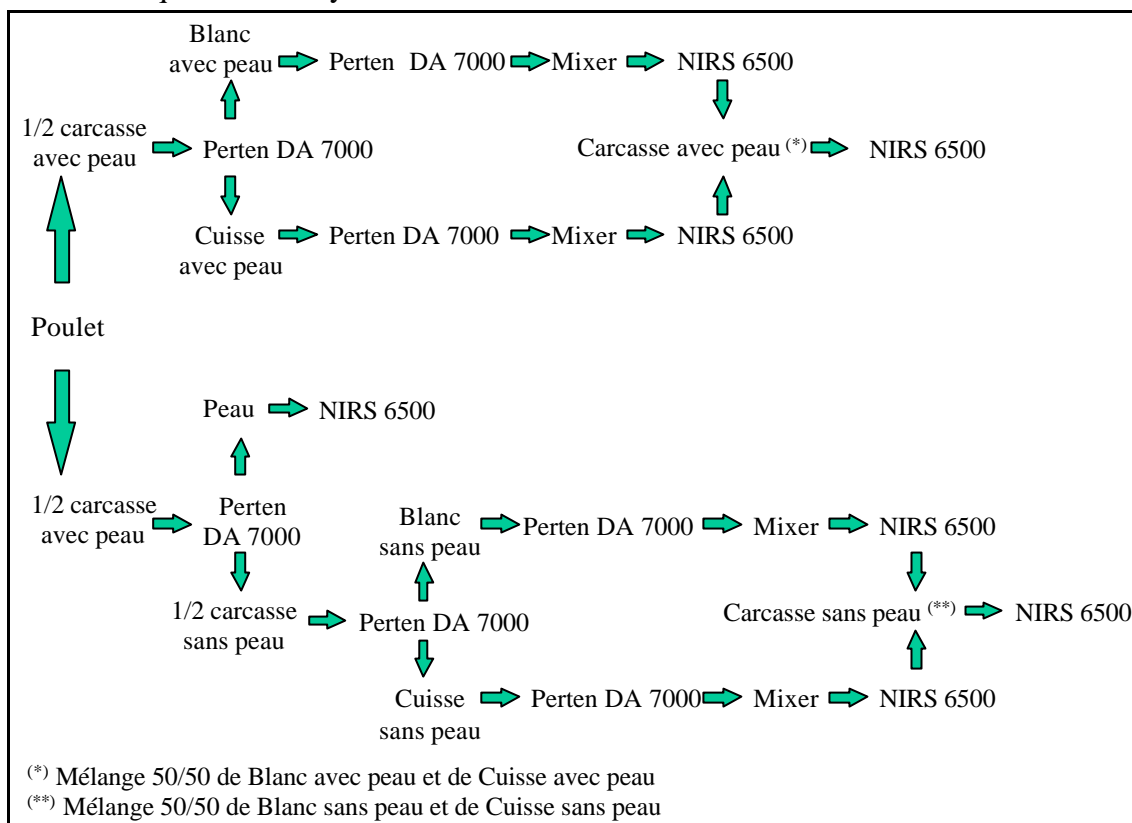
Pour chaque poulet analysé, sept échantillons ont été réalisés : le blanc sans peau, le blanc avec peau, la cuisse sans peau, la cuisse avec peau, la carcasse sans peau, la carcasse avec peau et la peau prise seule.

Parmi ces différents échantillons, certains nous intéressent plus particulièrement : le blanc sans peau, la cuisse avec peau, la carcasse avec peau et la peau prise seule. Les trois premiers correspondent aux produits présents dans le commerce ; la peau quant à elle est particulièrement riche en lipides. Or, l'analyse de la matière grasse a déjà été utilisée comme critère permettant de distinguer des volailles « label » de volailles « industrielles » (Girard *et al.*, 1993).

Ce nombre important d'échantillons pour chaque individu alourdit considérablement le travail : une personne seule ne parvient à analyser que +/- 4 poulets par jour. Actuellement, nous mettons au point un modèle statistique de discrimination entre poulets à croissance lente et poulets « industriels » pour chaque type d'échantillon. Dans une démarche de contrôle, il serait possible d'alléger le travail en choisissant d'analyser uniquement les types d'échantillons donnant les meilleurs modèles de discrimination.



La séquence d'analyse des échantillons est décrite ci-dessous.

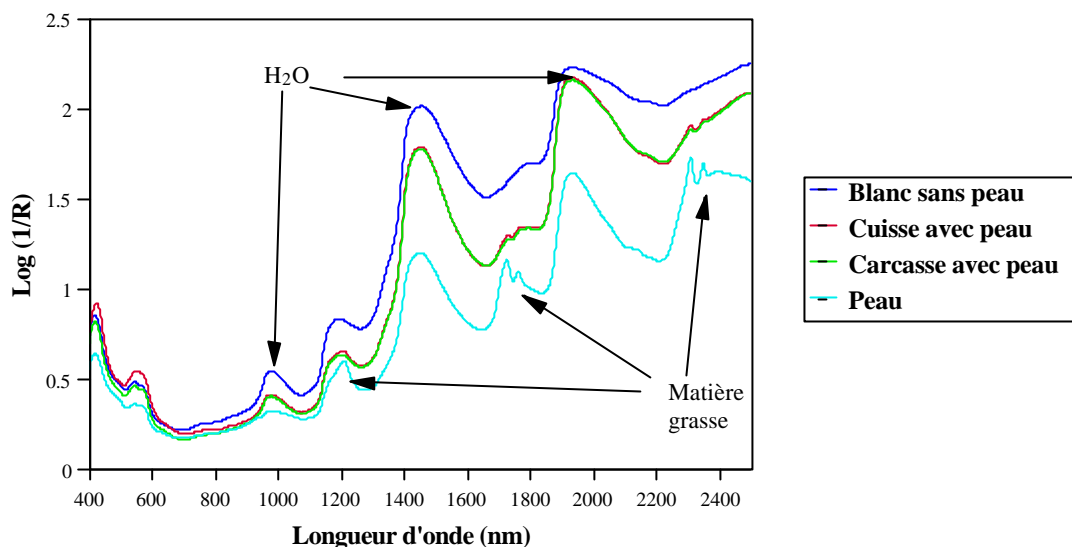


**Figure 7** : Protocole d'analyse des carcasses de poulets par spectrométrie dans le proche infrarouge (SPIR).

La durée du mixage de la viande est de +/- 1 minute ce qui permet d'obtenir un haché aussi homogène que possible. Pour chaque échantillon, 3 répétitions sont préparées et mesurées. La température de l'échantillon est mesurée immédiatement après que son spectre infrarouge ait été enregistré.

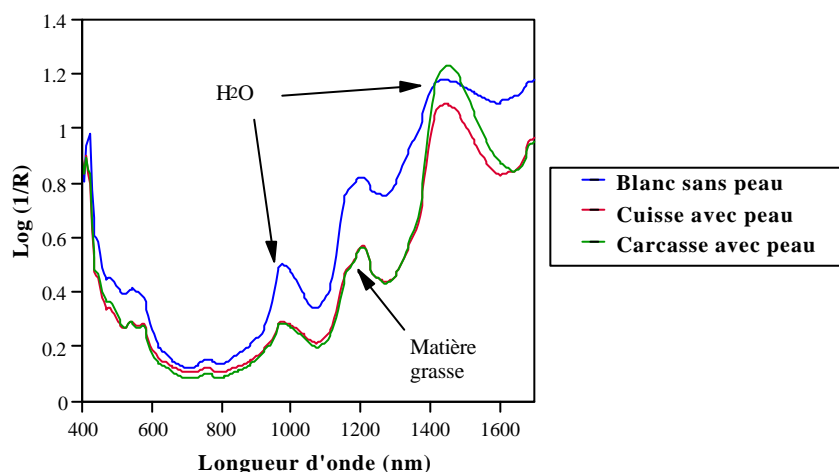
#### 2.4.2 Caractérisation des spectres

La Figure 8 montre les spectres moyens des échantillons de cuisses avec peau, blancs sans peau, carcasses avec peau et peaux obtenus avec le NIRS 6500. Les spectres montrent des pics caractéristiques de la matière grasse (1208, 1724, 1762, 2310 et 2348 nm) et de l'eau (980, 1450 et 1934 nm). Le spectre de peau est particulièrement illustratif de la forte concentration en lipides de ce type d'échantillon.



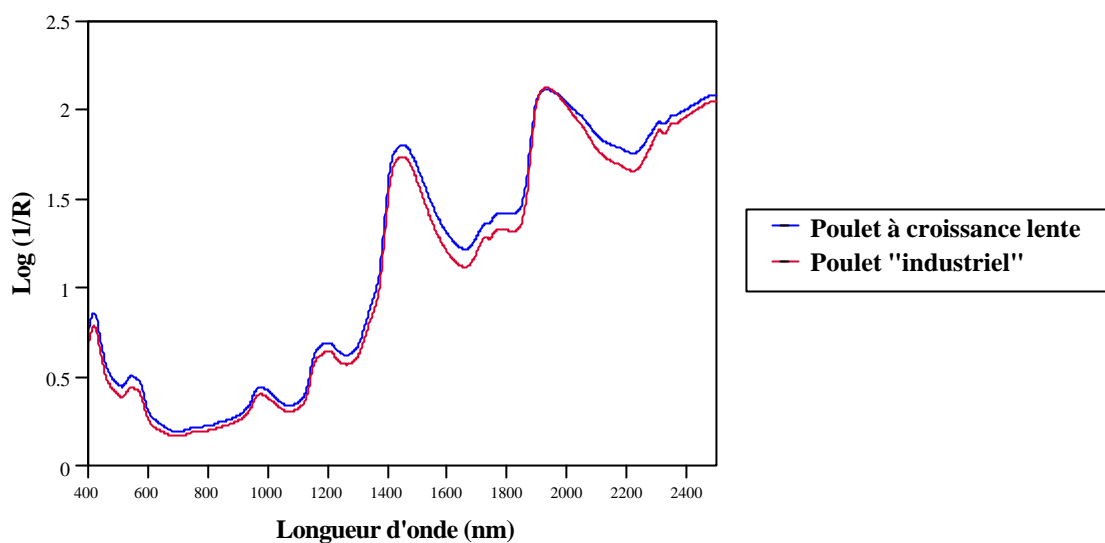
**Figure 8** : Spectres NIR moyens des échantillons de blancs sans peau, de cuisses avec peau, de carcasses avec peau et des peaux obtenus au moyen du NIRSystems 6500.

La Figure 9 montre les spectres moyens des échantillons de blancs sans peau, de cuisse avec peau et de carcasse avec peau obtenus avec le Perten DA 7000. Les spectres montrent des pics caractéristiques de la matière grasse à 1205 nm et de l'eau (975 et 1440 nm). Les spectres se caractérisent également par un important bruit de fond en dessous de 460 nm.



**Figure 9** : Spectres NIR moyens des échantillons de blancs sans peau, de cuisses avec peau et de carcasses avec peau obtenus au moyen du Perten DA 7000.

La Figure 10 montre les spectres moyens des “Poulets de Chair issus de souches à croissance lente” et des “Poulets industriels” à croissance rapide. Les deux spectres apparaissent très similaires. Au niveau spectral cependant, des différences importantes peuvent être soulignées. Pour le spectre moyen des poulets industriels, des bandes d'absorption plus intenses sont observables dans les régions correspondant aux lipides. Cette constatation pourrait s'expliquer par une teneur en matière grasse plus importante chez ce type de poulet. De telles différences ont déjà été observées par Cozzolino *et al.* (1996) et par Girard *et al.* (1993).



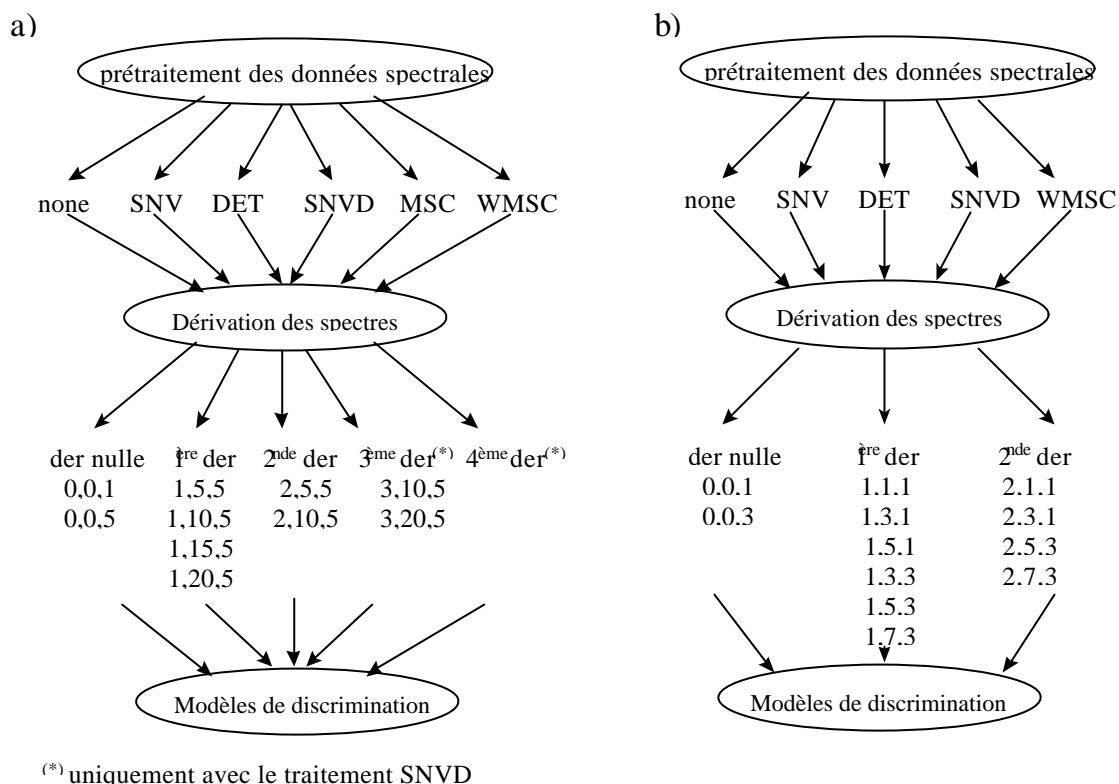
**Figure 10** : Spectres NIR moyens des échantillons de poulets issus de souches à croissance lente et de poulets “industriels” obtenus avec le NIRSystems 6500.

### 2.4.3 Classement statistique des échantillons

Le logiciel **ISI-NIRS 3, version 4.0** (INFRAISOFT INTERNATIONAL, Port Matilda, USA) a été utilisé pour réaliser l’analyse statistique des spectres infrarouge des échantillons.

Le logiciel ISI-NIRS 3 est un programme de spectrométrie dans le proche infrarouge. Il permet la mesure d’échantillons, le traitement de spectres et leur analyse statistique. Pour l’application qui nous occupe ici (distinction entre « poulet à croissance lente » et « poulet à croissance rapide »), l’option « Discriminate groups » a été utilisée.

64 et 60 traitements mathématiques ont été analysés sur les bases de spectres obtenus avec le NIRS 6500 et le Perten DA 7000. Les traitements utilisés ont été optimisés en fonction des spécificités des appareils. Les schémas globaux d’essais de calibrations et de discrimination sont décrits dans les Figures 11a et 11b.



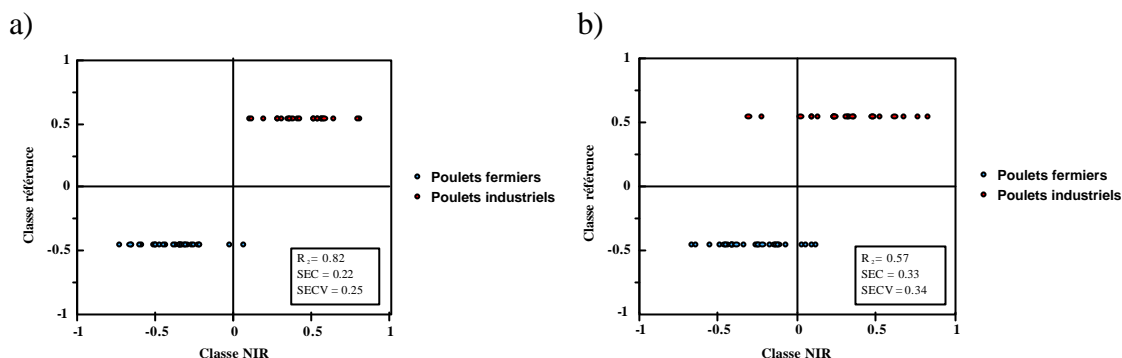
**Figures 11 a) et b) :** Schémas globaux des essais de calibration et de discrimination réalisés avec les bases de données établies au moyen des spectres mesurés sur a) le NIRSystems 6500 et b) le Perten DA 7000.

La première étape consiste en une calibration globale testant les 64 et 60 modèles de traitements des données. Une variable de classe est définie et calculée selon les formules suivantes :

$$X_{CrL} = \frac{-n_{CrR}}{n_{CrL} + n_{CrR}} \qquad X_{CrR} = \frac{n_{CrL}}{n_{CrL} + n_{CrR}}$$

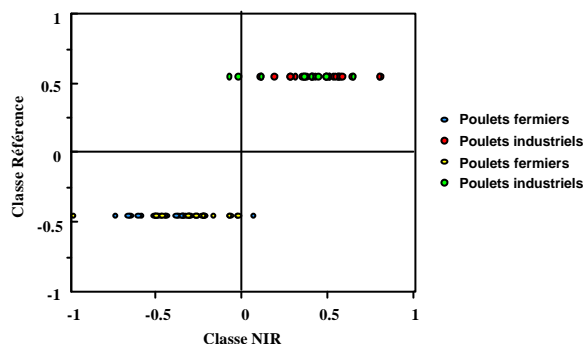
où  $n_{CrL}$  et  $n_{CrR}$  correspondent respectivement au nombre de « Poulets à croissance lente » et au nombre de « Poulets à croissance rapide ». De cette manière, un « Poulet à croissance lente » est caractérisé par une valeur de classe  $< 0$  et un « Poulet à croissance rapide » par une valeur de classe  $> 0$ .

Le choix des traitements à retenir se base sur les paramètres des équations développées ; le  $R^2$  doit être élevé et proche de 1 ; SEC et SECV doivent être faibles et proches l'un de l'autre. Les Figures 12a et 12b illustrent les résultats obtenus avec des échantillons de cuisses avec peau pour deux traitements : SNV 1,5,5,1 (Figure 11a) et DET 2,5,5,1 (Figure 11b).



**Figures 12 a) et b) :** Résultats de la calibration de la variable classe avec des échantillons de cuisses avec peau ; a) traitement SNV 1,5,5,1 et b) traitement DET 2,5,5,1.

On observe distinctement un chevauchement plus important des deux groupes de poulets avec le traitement DET 2,5,5,1 caractérisé par un  $R^2$  moins élevé et un SEC et un SECV plus élevés qu’avec le traitement SNV 1,5,5,1. Il est également possible de prédire de nouveaux échantillons avec les modèles développés. La Figure 13 montre les résultats obtenus avec de nouveaux échantillons n’ayant pas servi à la construction du modèle (set de validation).



**Figure 13 :** Résultats de la calibration de la variable classe avec des échantillons de cuisses avec peau (traitement SNV 1,5,5,1).

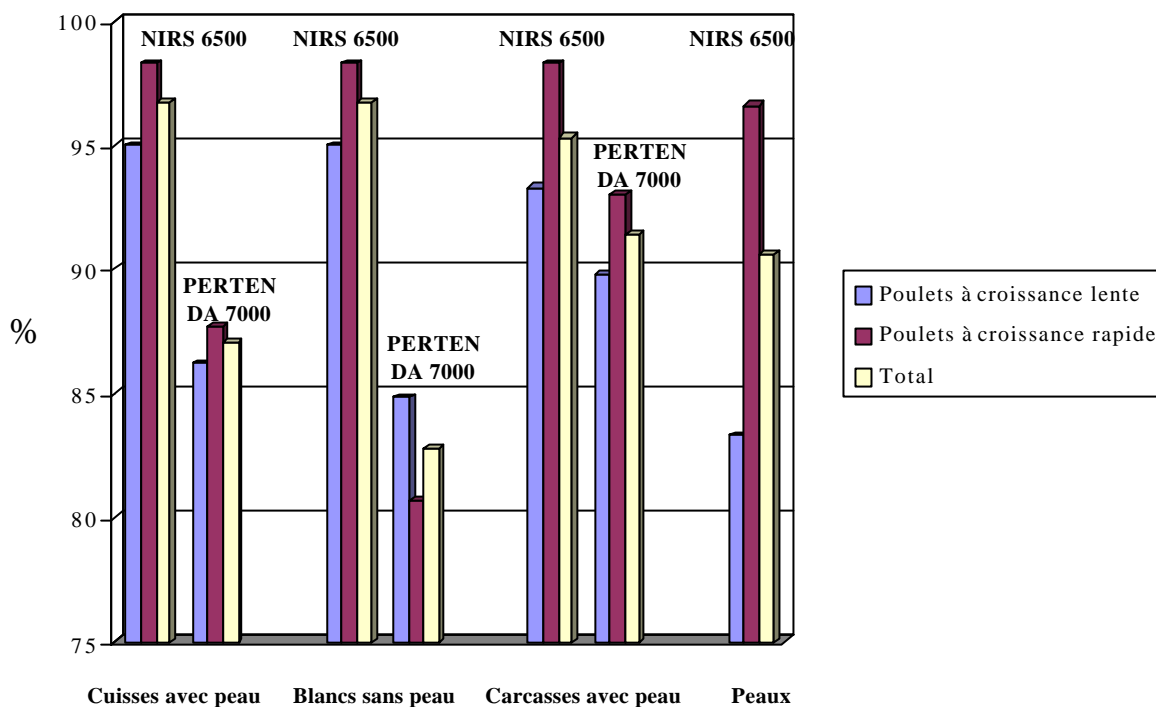
Les échantillons utilisés lors de la calibration sont désignés par les points ● et ● ; les nouveaux échantillons correspondent aux points ● et ●. Deux échantillons de poulets industriels sont, dans ce cas, affectés au groupe « Poulets Fermiers ».

La deuxième étape consiste à reprendre les meilleurs traitements mis en évidence lors de la calibration globale et à les tester avec l’option « Discriminate groups » basée sur une régression selon les moindres carrés partiels (PLS2).

Les modèles statistiques ont été construits en choisissant de manière aléatoire 2/3 des individus de chaque population. Le modèle ainsi établi a ensuite été validé avec un groupe test constitué par le tiers des individus restant. Dans la mesure du possible, les étapes de calibration et de validation de l’ensemble des modèles de discrimination ont été effectuées avec les échantillons provenant des mêmes poulets. De cette façon, la comparaison des performances des modèles obtenus avec les deux appareils (NIRS 6500 et Perten DA 7000) et avec les différents types d’échantillons est plus objective.

### 2.4.4 Résultats et discussion

La Figure 14 présente les performances des meilleurs modèles obtenus avec les échantillons de cuisses avec peau, blancs sans peau, carcasses avec peau et peaux.

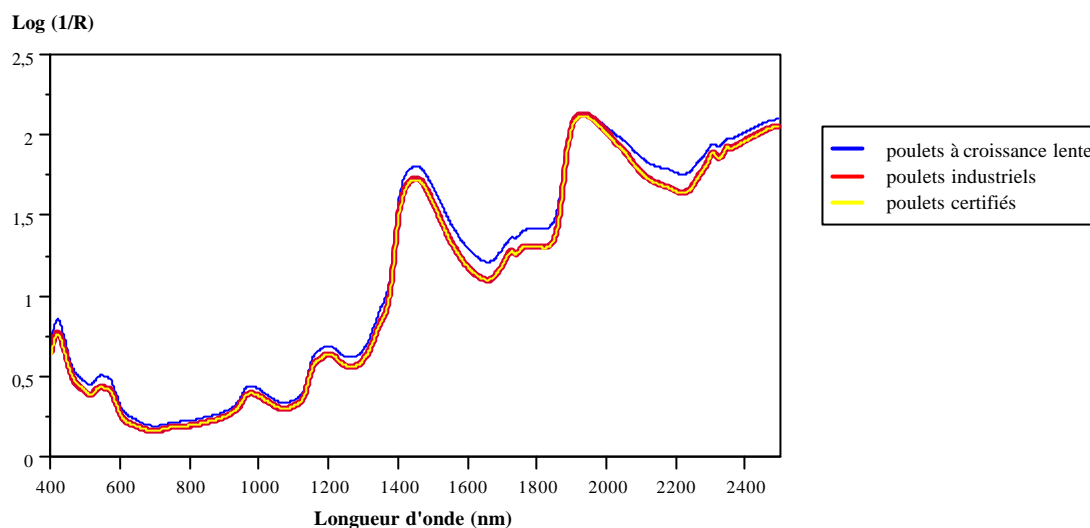


**Figure 14 :** Pourcentages d’affectations correctes obtenus en analyse discriminante avec 120 individus ; résultats obtenus pour les échantillons de cuisses avec peau, de blancs sans peau, de carcasses avec peau et de peaux avec le NIRS 6500 et le Perten DA 7000.

Ces résultats appellent les commentaires suivants :

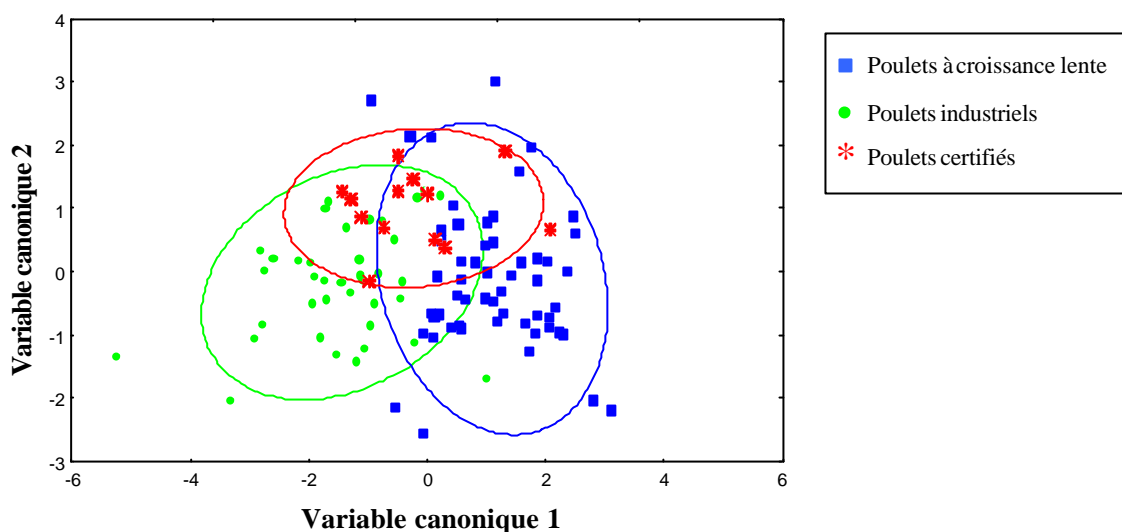
- Les performances des modèles obtenus avec le NIRS 6500 sont toujours supérieures aux performances des modèles obtenus avec le Perten DA 7000. Ceci est probablement dû aux caractéristiques mêmes des instruments (gamme de longueurs d’onde et résolutions) ainsi qu’à la préparation des échantillons (découpes entières pour le Perten DA 7000 – viande hachée pour le NIRS 6500).
- Les performances obtenues se situent généralement entre 85 % et 100 % de classifications correctes. Dans de nombreux cas, plus de 90 % des individus sont correctement classés.
- Les performances des modèles obtenus avec les blancs sans peau sont légèrement inférieures à celles obtenues avec les autres types d’échantillons. Les pourcentages d’affectations correctes se situent entre 80 – 85 % avec le Perten DA 7000.

Ces résultats sont obtenus en effectuant une classification selon deux groupes (les poulets à croissance lente et les poulets à croissance rapide). Dans le groupe des poulets industriels, nous avons repris 15 poulets faisant l'objet d'une certification. Il serait intéressant de pouvoir distinguer ces poulets certifiés des poulets industriels. Malgré la disproportion entre les groupes (60, 45 et 15 individus), nous avons testé des classifications en trois groupes. Systématiquement, les individus certifiés sont reclassés dans le groupe des poulets industriels. Ces résultats ne sont guère surprenants si on observe les spectres moyens des trois types de poulets (voir Figure 15). En effet, les spectres moyens des poulets industriels et des poulets certifiés se superposent parfaitement.



**Figure 15** : Spectres NIR moyens des échantillons de poulets issus de souches à croissance lente , de poulets industriels et de poulets certifiés obtenus avec le NIRSystems 6500.

L'analyse canonique (voir Figure 16), nous montre également que le groupe des poulets avec une certification alimentaire ne forment pas un groupe bien distinct des deux autres.



**Figure 16 :** Analyse canonique des spectres de blancs sans peau des poulets issus de souches à croissance lente, de poulets industriels (poulets à croissance rapide) et de poulets avec une certification alimentaire obtenus avec le NIRSystems 6500

Concrètement et sans remettre en cause l'originalité de ces produits que nous appellerons de qualité intermédiaire, il semble impossible, au moyen de la spectrométrie dans le proche infrarouge, de les distinguer des poulets industriels. Il faut cependant signaler que les classifications en trois groupes ont néanmoins permis d'améliorer encore les pourcentages d'affectations correctes des poulets à croissance lente et des poulets industriels.

Les deux spectromètres utilisés dans cette étude présentent des caractéristiques très différentes. Leur utilisation dans un contexte d'authentification dépendra de la stratégie de contrôle adoptée : le Perten DA 7000 permet une analyse systématique on-line ; le NIRS 6500 convient parfaitement pour un contrôle aléatoire des carcasses.



#### **2.4.5 Conclusions sur les performances obtenues par la technique de la spectrométrie dans le proche infrarouge**

Les performances des modèles de discrimination développés démontrent le potentiel de la SPIR pour distinguer les poulets issus de souches à croissance lente dans plus de 80 % des cas. La technique pourrait donc s'intégrer dans un système analytique de surveillance des produits certifiés comme moyen de screening préalable à des analyses plus longues et plus coûteuses comme la composition en graisse, le profil des protéines ou un test génétique.

Le choix du spectromètre à utiliser dépend des procédures de contrôle que l'on souhaite mettre en place. Le Perten DA 7000, par sa vitesse d'acquisition des données et la préparation minimale des échantillons, convient bien pour un contrôle on-line. Par contre, un contrôle reposant sur un nombre plus limité d'individus choisis de manière aléatoire sera plus efficace avec un NIRS 6500.

La base (composition de la carcasse, composition des graisses, teneur en eau, ...) sur laquelle repose la distinction entre les deux types de poulets n'a pas encore été déterminée. Cependant, en matière d'authentification et singulièrement avec les techniques spectroscopiques, deux stratégies peuvent être utilisées : soit le spectre est utilisé comme une empreinte permettant de classer les échantillons dans deux ou plusieurs groupes définis préalablement ; soit le spectre permet de doser un composé particulier. Dans le premier cas, la fraude sera difficile voire impossible puisque la base sur laquelle repose la classification n'est connue ni des contrôleurs, ni des fraudeurs. Il est cependant très important de s'assurer qu'aucun paramètre extérieur ne vienne fausser les mesures et ainsi influencer les modèles. Dans notre cas, nous essayons d'inclure dans nos bases de données un maximum de variabilité c'est-à-dire des poulets dont les origines sont diversifiées (marques, chaînes de grandes surfaces, ...) afin de couvrir aussi complètement que possible l'éventail des produits commercialisés en Belgique.

#### **2.4.6 Influence des interactions génotype x alimentation sur les spectres infrarouges de découpes de poulets standards et labels**

L'incidence des conditions d'élevage et de l'alimentation sur les performances, le comportement et la composition de la carcasse de deux génotypes de poulets, l'un à croissance rapide, l'autre à croissance lente, a été étudiée récemment (LEWIS *et al.*, 1997). Par ailleurs, GIRARD *et al.* (1993) ont pu discriminer deux populations, l'une de poulets « label fermier », l'autre de poulets standards, sur la base de leur composition en lipides.

L'objectif de la présente expérience est de voir dans quelle mesure les niveaux énergétiques et protéiques de l'aliment influencent les spectres infrarouge de découpes de poulets issus de souches à croissance lente ou rapide et de contrôler ainsi l'authenticité d'un des aspects du système de production de poulets « label fermier ». Le protocole de l'expérimentation est repris en annexe n° 5.

Concrètement, quatre groupes de 7 poulets ont été constitués : 2 groupes témoins (poulets à croissance lente nourris avec un aliment « label » et poulets à croissance

rapide nourris avec un aliment standard) et 2 groupes faisant l'objet d'une fraude au niveau de l'alimentation des animaux (poulets à croissance lente nourris avec un aliment standard et poulets à croissance rapide nourris avec un aliment « label »). L'avantage économique que pourrait apporter ces deux types de fraude réside essentiellement dans le raccourcissement de la période nécessaire pour atteindre le poids d'abattage.

Les modèles de discrimination développés au point 2.4.3. ont été actualisés en incorporant aux bases de calibration de nouveaux échantillons (3 poulets à croissance lente, 3 poulets à croissance rapide, 4 découpes de cuisses, 5 découpes de blancs). Les échantillons de poulets appartenant aux groupes témoins (14 poulets) ont également été utilisés pour mettre à jour les équations de discrimination.

Les modèles de discrimination obtenus ont été utilisés pour prédire le groupe auquel est affecté chaque échantillon.

Pour les poulets de cette expérimentation, nous avons analysés 3 types d'échantillons : les cuisses avec peau, les blancs sans peau et les carcasses avec peau. Chaque blanc et chaque cuisse a été analysé séparément. Ce sont donc 14 mesures (2 échantillons x 7 poulets) qui ont été enregistrées. Les mesures ont été effectuées avec les deux spectromètres décrits au point 2.4.1.

Les résultats obtenus respectivement avec le NIRsystems 6500 et le Perten DA 7000 sont décrits dans les tableaux 4 et 5.

Avec le NIRS 6500, les échantillons des poulets appartenant aux groupes témoins sont tous correctement classés quel que soit le type d'échantillon.

Les échantillons des poulets appartenant aux groupes « frauduleux » sont majoritairement classés comme des poulets à croissance rapide (en moyenne > 75 % des échantillons). Cette observation est particulièrement vraie pour les poulets à croissance rapide nourris avec l'aliment label (> 90 % des échantillons).

Il apparaît donc sur base de ces résultats que les modèles de discrimination développés sur base du spectre dans le proche infrarouge de la viande pourraient détecter quelque 75 % des fraudes (poulets élevés dans des conditions ne respectant pas le cahier des charges imposant l'utilisation de souches à croissance lente **et** une alimentation spécifique).

Le Perten DA 7000 permet d'obtenir des résultats comparables. Seul 1 échantillon issu d'un groupe témoin est mal classé (échantillon de blanc). Le modèle de discrimination développé avec les échantillons de blancs est d'ailleurs celui qui donne les résultats les moins bons puisque seulement 71 % des échantillons provenant des groupes « frauduleux » (20 échantillons sur 28) sont classés comme appartenant à un poulet à croissance rapide.

**Tableau 4** : Classement des échantillons de cuisses avec peau, de blancs sans peau et de carcasses avec peau mesurés au NIRsystems 7500

	Poulets issus de souches à croissance rapide	Poulets issus de souches à croissance lente
<b>Echantillons de cuisses avec peau</b>		
Poulets à croissance rapide Aliment standard (groupe témoin)	14/14 100 %	0/14 0 %
Poulets à croissance rapide Aliment label	13/14 92.9 %	1/14 7.1 %
Poulets à croissance lente Aliment standard	8/14 57.1 %	6/14 42.9 %
Poulets à croissance lente Aliment label (groupe témoin)	0/14 0 %	14/14 100 %
<b>Echantillons de blancs sans peau</b>		
Poulets à croissance rapide Aliment standard (groupe témoin)	14/14 100 %	0/14 0 %
Poulets à croissance rapide Aliment label	13/14 92.9 %	1/14 7.1 %
Poulets à croissance lente Aliment standard	12/14 85.7 %	2/14 14.3 %
Poulets à croissance lente Aliment label (groupe témoin)	0/14 0 %	14/14 100 %
<b>Echantillons de carcasses avec peau</b>		
Poulets à croissance rapide Aliment standard (groupe témoin)	13/13 100 %	0/13 0 %
Poulets à croissance rapide Aliment label	14/14 100 %	0/14 0 %
Poulets à croissance lente Aliment standard	10/14 71.4 %	4/14 28.6 %
Poulets à croissance lente Aliment label (groupe témoin)	0/14 0 %	14/14 100 %

**Tableau 5** : Classement des échantillons de cuisses avec peau, de blancs sans peau et de carcasses avec peau mesurés au Perten DA 7000

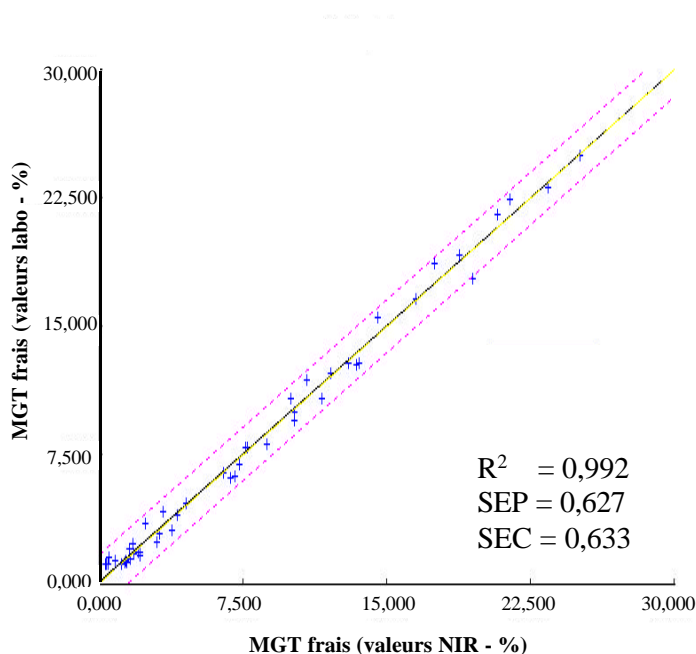
	Poulets issus de souches à croissance rapide	Poulets issus de souches à croissance lente
<b>Echantillons de cuisses avec peau</b>		
Poulets à croissance rapide Aliment standard (groupe témoin)	14/14 100 %	0/14 0 %
Poulets à croissance rapide Aliment label	13/14 92.9 %	1/14 7.1 %
Poulets à croissance lente Aliment standard	8/14 57.1 %	6/14 42.9 %
Poulets à croissance lente Aliment label (groupe témoin)	0/14 0 %	14/14 100 %
<b>Echantillons de blancs sans peau</b>		
Poulets à croissance rapide Aliment standard (groupe témoin)	13/14 92.9 %	1/14 7.1 %
Poulets à croissance rapide Aliment label	8/14 57.1 %	6/14 42.9 %
Poulets à croissance lente Aliment standard	12/14 85.7 %	2/14 14.3 %
Poulets à croissance lente Aliment label (groupe témoin)	0/13 0 %	13/13 100 %
<b>Echantillons de carcasses avec peau</b>		
Poulets à croissance rapide Aliment standard (groupe témoin)	14/14 100 %	0/14 0 %
Poulets à croissance rapide Aliment label	14/14 100 %	0/14 0 %
Poulets à croissance lente Aliment standard	10/14 71.4 %	4/14 28.6 %
Poulets à croissance lente Aliment label (groupe témoin)	0/14 0 %	14/14 100 %

**2.4.7 Analyse de la matière grasse présente dans la viande de poulet**

Un des paramètres pouvant expliquer les différences spectrales observées entre les échantillons de viandes provenant de poulets à croissance lente ou rapide est leur richesse en lipides. Des différences quantitatives et qualitatives ont déjà été observées par Cozzolino *et al.* (1996) et par Girard *et al.*(1993).

Une étude de la matière grasse contenue dans les échantillons analysés par spectrométrie dans le proche infrarouge a donc été réalisée. Le dosage de la matière grasse totale et sa composition en acides gras ont été effectués sur un nombre limité d'échantillons (liste des échantillons analysés et résultats – voir annexe n° 6).

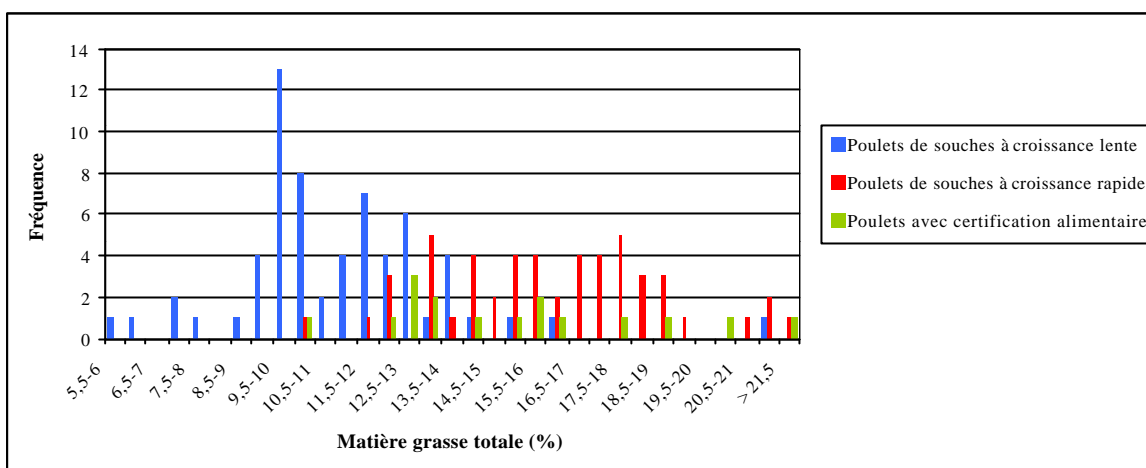
Pour la matière grasse totale, une équation de calibration a été développée. La figure 17 montre la relation entre les valeurs de référence (valeur du laboratoire) et les prédictions obtenues par spectrométrie dans le proche infrarouge (valeur NIR) pour le dosage de la matière grasse totale.



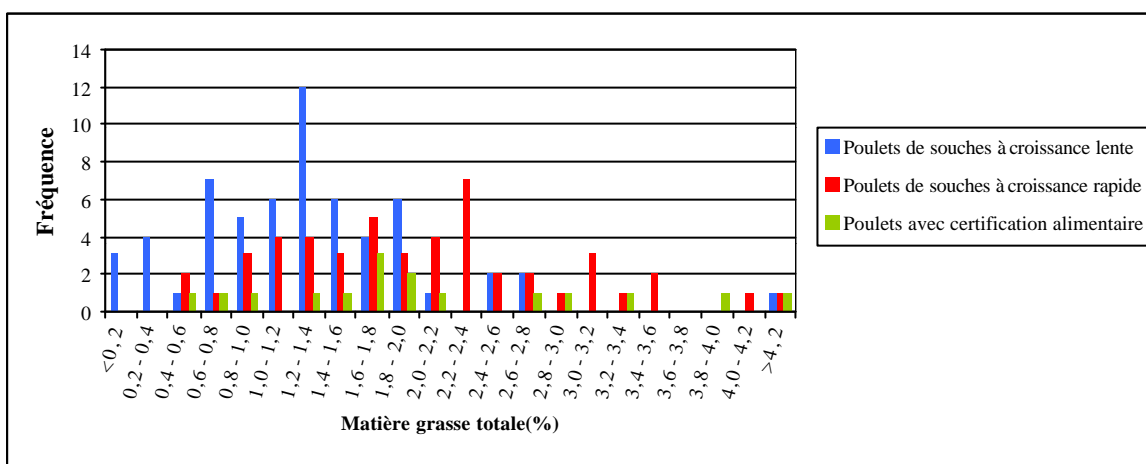
**Figure 17 :** Relation entre les valeurs de référence (valeur du laboratoire) et les prédictions obtenues par spectrométrie dans le proche infrarouge (valeur NIR) pour le dosage de la matière grasse totale.

Cette équation de calibration a été utilisée pour prédire la teneur en matière grasse totale de l'ensemble des échantillons mesurés par spectrométrie dans le proche infrarouge pour le développement de modèles de discrimination. La figure 18 a, b et c montrent la distribution des teneurs en matière grasse totale respectivement pour les échantillons de cuisses, de blancs et de carcasses.

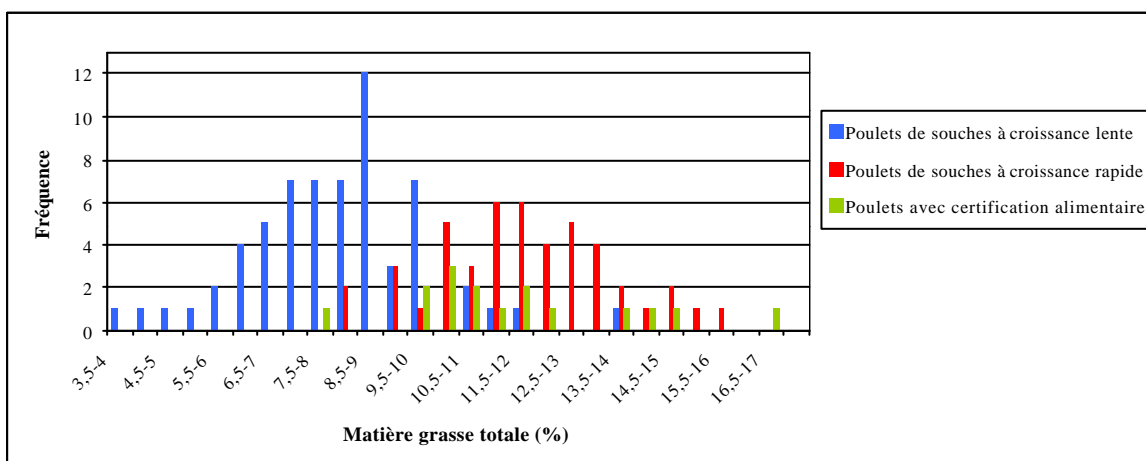
a) Echantillons de cuisses



b) Echantillons de blancs



c) Echantillons de carcasses



**Figure 18 :** Distributions des teneurs en matière grasse totale (valeurs estimées par spectrométrie dans le proche infrarouge) respectivement a) dans les échantillons de cuisses, b) dans les échantillons de blancs et c) dans les échantillons de carcasses des poulets achetés dans le commerce.

Les résultats obtenus confirment ce qui est décrit dans la littérature. Les poulets issus de souches à croissance lente utilisés dans les productions labélisées présentent globalement des teneurs en matière grasse plus faibles que les poulets issus de souches à croissance rapide élevés dans les systèmes de production intensifs.

Les gammes obtenues sont assez larges pour les échantillons de cuisses (5,6 % - 25,1 %) et de carcasses (3,9 – 19,5 %). Les échantillons de blancs sont nettement plus maigres (0,2 % - 6,4 %) mais il faut préciser que ce dernier type d'échantillons était mesuré en l'absence de peau particulièrement riche en lipides.

Remarquons que les poulets élevés dans des systèmes de production se pliant à des exigences alimentaires particulières (dénommés ici « Poulets avec certification alimentaire ») présentent des teneurs en matière grasse couvrant les mêmes gammes que celles des poulets à croissance rapide. Ces résultats confirment la similitude des deux types de produits.

Au vu des résultats présentés ici, il est clair que ce paramètre ne pourrait être retenu comme critère permettant de distinguer les deux types de souches. La variabilité individuelle est trop importante et la zone de recouvrement entre les populations de poulets à croissance lente ou rapide est trop large.

La même équation de calibration a été utilisée pour prédire les teneurs en matière grasse totale des échantillons obtenus dans le cadre de l'expérimentation animale menée par l'Unité de Zootechnie (figure 19).

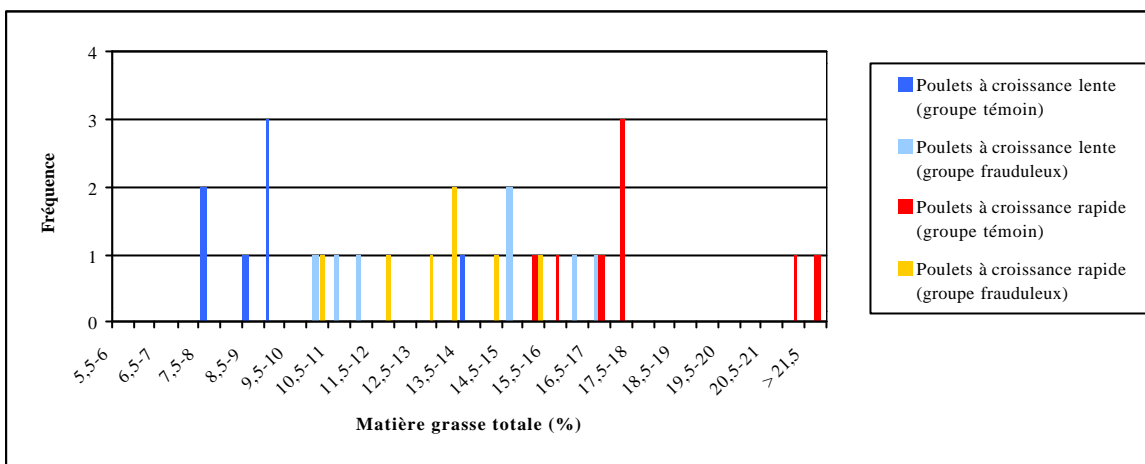
En règle générale, les individus appartenant aux deux groupes témoins (poulets à croissance lente nourris avec un aliment label et poulets à croissance rapide nourris avec un aliment standard) se situent aux extrémités des distributions. Ils se comportent bien comme les poulets du commerce (faibles teneurs en matière grasse pour les poulets à croissance lente et teneurs élevées pour les poulets à croissance rapide).

Les poulets provenant des deux groupes dits « frauduleux » (poulets à croissance lente nourris avec un aliment standard et poulets à croissance rapide nourris avec un aliment label) présentent des teneurs en matière grasse intermédiaires. Pour les échantillons de cuisses et de blancs, les poulets à croissance rapide nourris avec l'aliment label présentent des teneurs en matière grasse inférieures à celles des poulets à croissance lente nourris avec l'aliment industriel. Pour les échantillons de carcasses, on observe la situation inverse.

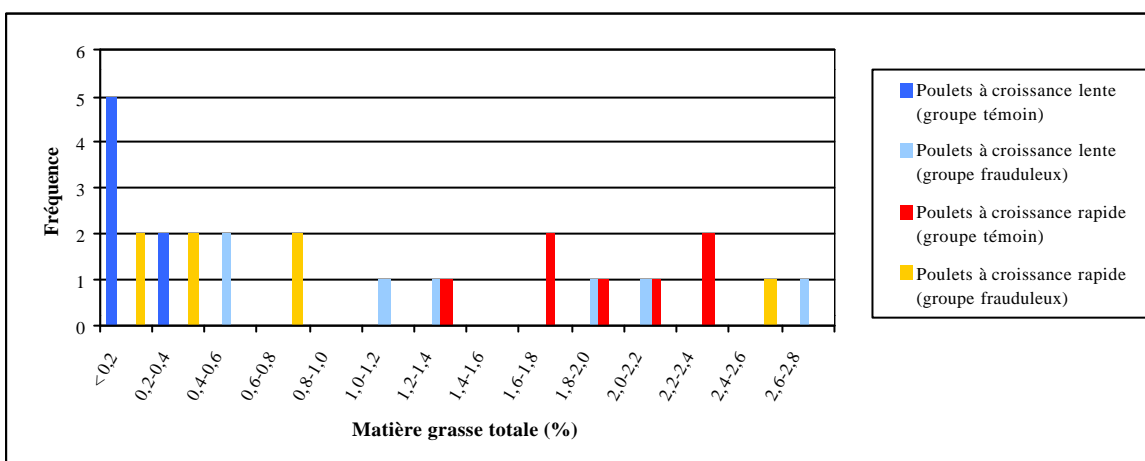
En conclusion, l'alimentation a clairement un effet sur la teneur en matière grasse de la viande. Le type de souche semble également jouer : les poulets à croissance lente sont, pour une même alimentation, moins gras que les poulets à croissance rapide.

Il est à noter qu'un régime alimentaire plus énergétique a permis d'atteindre le poids commercial 11 jours plus tôt pour les poulets à croissance lente (79 jours (aliment label) contre 68 jours (aliment standard)) et de gagner 7 jours pour les poulets à croissance rapide (51 jours (aliment label) contre 44 jours (aliment standard)).

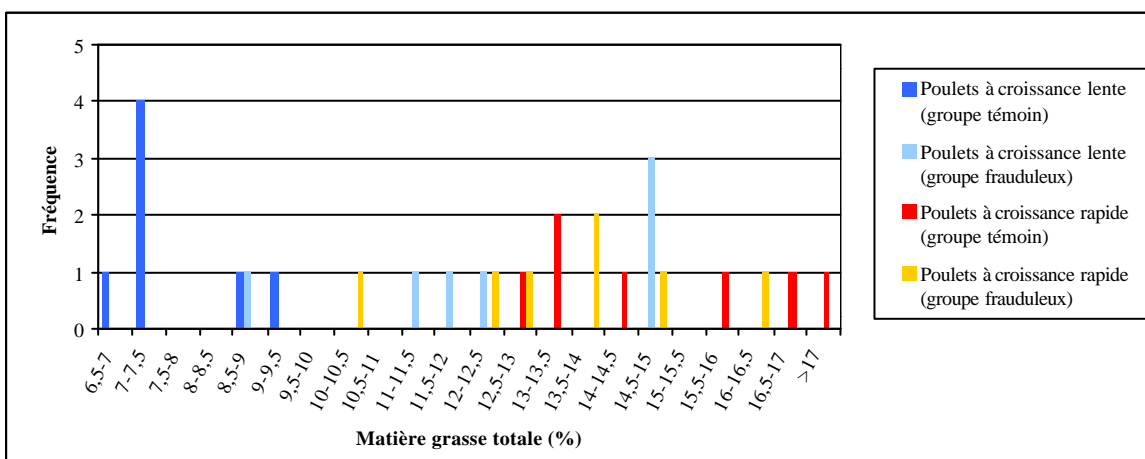
a) Echantillons de cuisses



b) Echantillons de blancs



c) Echantillons de carcasses



**Figure 19 :** Distributions des teneurs en matière grasse totale (valeurs estimées par spectrométrie dans le proche infrarouge) respectivement a) dans les échantillons de cuisses, b) dans les échantillons de blancs et c) dans les échantillons de carcasses des poulets élevés dans le cadre de l’expérimentation animale réalisée à l’Unité de Zootechnie de la FUSAGx.



## **2.5 Potentialités de l'électrophorèse capillaire pour la caractérisation de l'origine de viandes sur base de leur profil en protéines**

Les analyses ont été réalisées avec le P/ACE™ System 5500 de Beckman. Cet appareil est équipé d'un détecteur à diodes (DAD) et est contrôlé par le logiciel System Gold® Software version 8.0.

### **2.5.1 Mise au point du protocole d'extraction des protéines**

Les protocoles d'extraction ont été tirés de l'article de Cota-Rivas et Vallejo-Cordoba (1997) et adaptés aux équipements présents dans notre département. L'article décrit deux extractions : une *extraction aqueuse* pour les protéines sarcoplasmiques et une *extraction saline* (tampon 0.6 M NaCl/0.01 M phosphate - 0.5% polyphosphates à pH 6.0) pour les protéines myofibrillaires.

#### **2.5.1.1 Extraction aqueuse des protéines sarcoplasmiques**

Dans un premier temps, nous avons testé l'extraction aqueuse car elle ne nécessite l'utilisation d'aucun produit particulier : sa mise en pratique est donc très simple.

10 g d'échantillon  
30 ml d'H<sub>2</sub>O bidistillée

Homogénéisation à l'Ultra-turrax pendant 2 x 10 secondes séparées par 10 secondes de refroidissement sur glace ;  
Centrifugation à 7710 g pendant 15 minutes à 4°C ;  
Filtration du surnageant.

#### **2.5.1.2 Extraction saline des protéines myofibrillaires**

L'extraction saline des protéines myofibrillaires décrite par Cota-Rivas et Vallejo-Cordoba (1997) est identique à l'extraction aqueuse. Seul, le tampon d'extraction (0.6 M NaCl/0.01 M phosphate - 0.5% polyphosphates à pH 6.0) est différent. En testant ce protocole, nous avons rencontré des problèmes de solubilisation des protéines et de filtration des surnageants après centrifugation. De tels problèmes sont développés dans la littérature. Toorop *et al.* (1997), dans un article décrivant une méthode pour séparer et quantifier les protéines myofibrillaires dans la viande par HPLC, détaillent les paramètres d'extraction à optimiser : le pH et la force ionique du tampon d'extraction, le rapport entre la quantité d'échantillon et le volume de tampon, les conditions d'homogénéisation et de centrifugation.

### **2.5.2 Préparation des échantillons à l'analyse par électrophorèse capillaire**

Le kit utilisé pour l'analyse est le « eCAP™SDS 14-200 Kit » (BECKMAN INSTRUMENTS INC., Fullerton, USA).

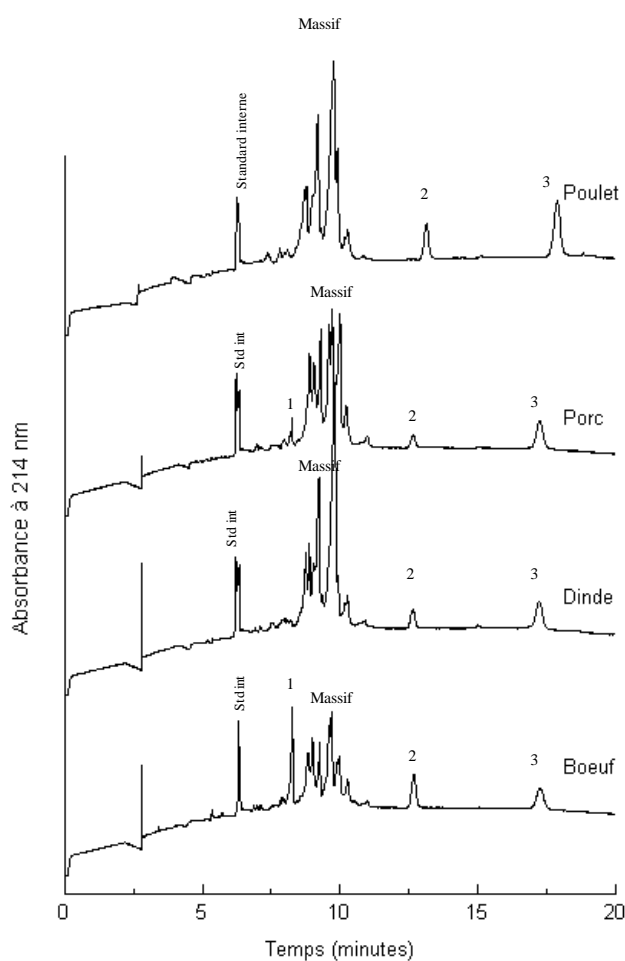
30-50 µl de surnageant contenant les protéines (voir extraction)  
100 µl de « sample buffer »  
10 µl d'Orange G (standard interne)  
5 µl de 2-mercaptoéthanol  
85 µl d'H<sub>2</sub>O bidistillée  
Agitation au vortex pendant 2 minutes ;

Incubation dans un bain-marie à 100°C pendant 10 minutes ;  
Incubation à 4°C pendant 3 minutes avant injection.

### 2.5.3 Analyse des échantillons

Dans un premier temps, nous nous sommes attachés, comme décrit dans l'article qui nous a servi de référence (Cota-Rivas et Vallejo-Cordoba, 1997), à mettre en évidence des différences entre les électrophorégrammes de différentes espèces (boeuf, porc et dinde) auxquelles nous avons ajouté le poulet.

La Figure 14 reprend les profils de protéines sarcoplasmiques (extraction aqueuse) obtenus pour les quatre espèces animales. Les profils obtenus diffèrent aussi bien d'un point de vue qualitatif que quantitatif.



**Figure 20 :** Electrophorégrammes des protéines sarcoplasmiques de quatre espèces animales (poulet, porc, dinde et boeuf). Conditions expérimentales : 'SDS coated capillary' 100µm de diamètre interne, 27 cm (20 cm jusqu'au détecteur) ; 20°C ; 'SDS Gel Buffer' ; 8,1 kV ; injection 30 sec à 0,5 psi ; détection en absorbance UV à 214 nm

Les profils électrophorétiques obtenus se caractérisent par la présence du pic du standard interne Orange G, du pic 1 précédant un important massif et des pics 2 et 3. Le pic 1 est bien résolu et d'une intensité suffisante pour être détecté chez le porc et le bœuf. La distinction entre ces deux espèces peut ensuite être opérée sur le rapport des pics 2 et 3 (pic 2 > pic 3 chez le bœuf). La distinction entre le poulet et la dinde peut être effectuée sur base du massif de pics et des pics 2 et 3. Le profil électrophorétique de la dinde se caractérise par un pic particulièrement important à la fin du massif ; par contre, chez le poulet, les pics 2 et 3 sont proportionnellement plus importants par rapport au massif.

Nous avons ensuite appliqué la même méthode électrophorétique aux protéines sarcoplasmiques extraites de viandes de poulets de souches à croissance lente et de poulets industriels. A ce jour, nous n'avons malheureusement pas pu mettre en évidence de différences entre les profils protéiques des deux catégories de poulets.

En ce qui concerne l'extraction saline des protéines myofibrillaires sur les mêmes individus, nous avons rencontré des problèmes de solubilisation des protéines et de filtration du surnageant après centrifugation. De tels problèmes sont décrits dans la littérature ; Toorop *et al.*(1997) notamment détaillent les paramètres d'extraction à optimiser. Il s'agit du pH et de la force ionique du tampon d'extraction, du rapport entre la quantité d'échantillon et le volume du tampon d'extraction, des conditions d'homogénéisation et de centrifugation. Le protocole d'extraction des protéines est à revoir et à adapter.

#### **2.5.4 Conclusions**

La différenciation entre espèces animales (boeuf, porc, dinde et poulet) par électrophorèse capillaire a pu être reproduite avec le matériel présent au sein de notre département. Cependant, nous n'avons pu mettre en évidence une différence entre les profils protéiques de poulets issus de souches à croissance lente d'une part et de poulets issus de souches à croissance rapides d'autre part.

Il faut également signaler que ces analyses ont été réalisées sur des échantillons « purs ». Il apparaît évident, qu'étant donné les similitudes profondes des électrophorégrammes correspondant aux quatre types de viandes, que l'analyse de mélanges serait extrêmement difficile à réaliser.

*Développement de méthodes de contrôle  
des normes d'élevage relatives à l'alimentation  
des poulets de productions certifiées*

### ***3. Développement de méthodes de contrôle des normes d'élevage relatives à l'alimentation des poulets de productions certifiées***

#### ***3.1 Introduction***

Les cahiers des charges des productions de volailles certifiées détaillent le contrôle de la conformité des aliments composés. Leur critères se focalisent essentiellement sur la nature et les proportions des différents ingrédients, et notamment l'absence de farines animales.

La SPIR a déjà été largement étudiée pour l'analyse quantitative des aliments pour bétail. Des critères tels que teneur en protéines, en matières grasses et en fibres peuvent être prédits à partir d'étalonnages établis sur poudres ou sur aliments composés tels quels (Biston et Dardenne, 1986). La SPIR permet également la prédiction de critères tels que la digestibilité qui repose sur des expérimentations de nutrition animale particulièrement longues et coûteuses (Biston *et al.*, 1989). Venant en complément des aspects nutritionnels de la qualité, le contrôle de conformité envisagé ici concerne la détermination de la nature et des proportions des différents ingrédients constituant l'aliment. L'intérêt serait de trouver une alternative à la méthode de référence basée sur l'examen microscopique qui s'avère longue et qui requiert une grande expérience.

Le contrôle de l'absence d'antibiotiques est également une préoccupation mise en évidence dans les cahiers des charges. Si des techniques analytiques performantes (HPLC) sont disponibles pour réaliser une identification et un dosage d'antibiotiques (Moran *et al.*, 1995), elles ne sont cependant pas encore applicables à des échantillons d'aliments où un pouvoir inhibiteur a été mis en évidence et aucune certitude ne peut être apportée quant à la présence effective d'un antibiotique. Certaines de ces techniques sont utilisées pour contrôler la teneur en antibiotiques annoncée par le fabricant. La multiplicité des interférences possibles et un respect strict des normes déjà existantes ne permettent pas aux laboratoires de contrôle et aux organismes certificateurs de se limiter à la seule détection des antibiotiques par la voie microbiologique. La confirmation de l'influence supposée de différents paramètres de l'alimentation (acidité, complémentation en oligo-éléments, complémentation en vitamines) sur les souches bactériennes de référence utilisées lors de la mise en évidence du pouvoir inhibiteur et la mise en place de techniques analytiques (HPLC) utilisables lors de la confirmation de la présence d'inhibiteur (identification et dosage) permettraient un contrôle des échantillons ayant donné une réponse positive lors du screening microbiologique.

#### ***3.2 Echantillonnage d'aliments pour poulets de productions certifiées***

##### ***3.2.1 Inventaire et typologie des aliments certifiés commercialisés dans le pays***

Il ressort des différents contacts établis jusqu'à présent qu'un très grand nombre de matières premières différentes entrent dans la fabrication des aliments pour animaux (voir § 3.2.3.1). D'autre part, la formule ouverte des aliments fait partie des « secrets de fabrication » des producteurs. Elle est d'autant plus difficilement accessible que la législation n'impose pas sa diffusion.

### 3.2.2 Collecte des échantillons

Des échantillons de matières premières entrant dans la fabrication d'aliments ont été obtenus auprès de la firme « RADAR N.V. » et analysés. Des échantillons d'aliments nous ont également été fournis par le Laboratoire d'Analyses de l'Etat à Tervuren.

Malgré de bons contacts avec la firme RADAR N.V., il fut impossible de connaître la formule ouverte (composition en matières premières) des aliments. Celle-ci fait en effet partie des secrets de fabrication de chaque producteur.

### 3.2.3 Authentification des formules d'aliments composés sur base de la SPIR

#### 3.2.3.1 Constitution d'une gamme d'échantillons de référence

Dans un premier temps, nous avons envisagé de collecter des échantillons de matières premières entrant dans la fabrication d'aliments pour bétail. Ces échantillons devaient par la suite nous servir à réaliser des formulations d'aliments. Des contacts ont été établis en ce sens avec la firme « RADAR N.V. » qui a accepté de nous aider.

Les échantillons fournis ont été analysés avec un appareil NIRS 5000. Cet appareil est couramment utilisé pour mesurer les spectres infrarouge de produits pulvérulents.



**Photo 8:** Appareil NIRSystems 5000 en configuration Spinning utilisé lors de l'analyse d'échantillons d'aliments pour bétail

Il est cependant apparu que le nombre de matières premières différentes entrant dans la fabrication d'aliments pour animaux est particulièrement élevé (+/- 700 références). Ces matières premières diffèrent par leur constituant de base (par exemple : céréales, protéagineux, cocotier, farines d'origine animale,...), par leur origine géographique (européenne, américaine, asiatique,...), par leur variété ou par leur conditionnement (farines, glutenfeed, tourteaux,...). Cette variabilité au niveau des matières premières rend pratiquement impossible la constitution d'une gamme d'échantillons complète par cette voie.

Nous poursuivons néanmoins la collecte et la mesure d'échantillons de matières premières. Nous pensons qu'ils nous seront utiles pour la détermination des paramètres permettant de distinguer les aliments certifiés des ordinaires par SPIR. D'autre part, ces échantillons sont exploités dans le cadre d'une autre technique (la microscopie NIR) décrite ci-dessous (voir § 3.2.3.2).

### **3.2.3.2 Authentification de farines pour bétail par microscopie dans le proche infrarouge**

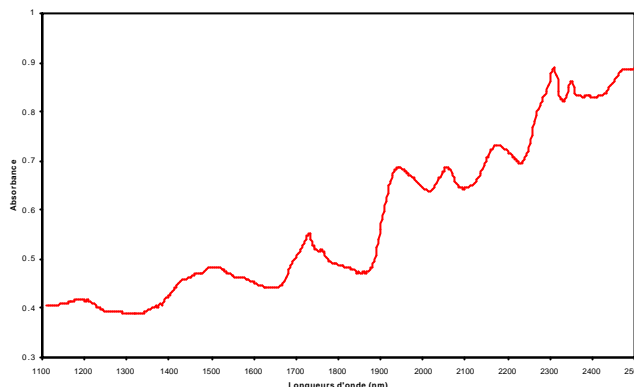
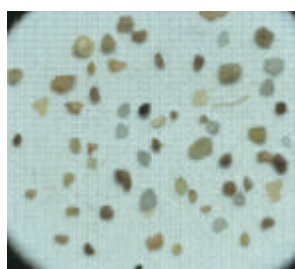
#### **3.2.3.2.1 Introduction**

Le microscope dans le proche infrarouge présent au Département Qualité des Productions Agricoles est utilisé pour développer des modèles d'analyses permettant de déterminer la composition qualitative et quantitative de farines composées de différentes matières premières mais aussi d'y mettre en évidence la présence de particules d'origine animale. Ce travail a, dans un premier temps, fait l'objet d'un contrat de recherche avec le Fonds des matières premières géré par l'Inspection générale des Matières premières et Produits transformés du Ministère de l'Agriculture et des Classes Moyennes (DG4). Actuellement, cette technique est utilisée dans le cadre du projet européen «STRATFEED» (Strategies and Methods to detect and quantify mammalian tissues in feedingstuffs – projet n° GRD1-2000-25002).



**Photos 9 et 10** : Microscope-NIR (Perkin-Elmer) utilisé lors de l'analyse d'échantillons d'aliments pour bétail

Le microscope-NIR permet de prendre le spectre infrarouge d'une seule particule provenant d'un échantillon de farine. Succinctement, au niveau du microscope, une caméra vidéo permet de visualiser l'échantillon et de localiser au sein de celui-ci la particule à analyser. Un rayon infrarouge est ensuite dirigé sur la particule et un détecteur situé dans le microscope permet d'enregistrer son spectre infrarouge.



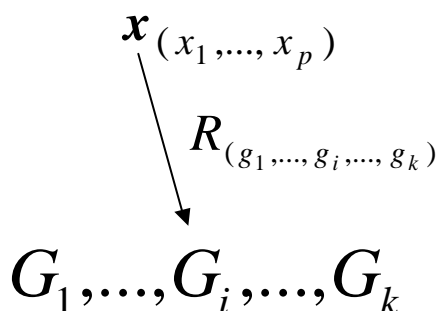
**Photos 11 et 12** : Particules de farine d'aliment pour animaux vues au microscope optique et spectre obtenu avec le microscope NIR

Actuellement, des particules constitutives des matières premières entrant dans la composition d'aliments pour animaux sont analysées afin de constituer des bibliothèques de spectres. Les échantillons obtenus auprès de la firme « RADAR N.V. » nous sont pour cela d'une grande utilité. Ce travail est à la fois primordial (il conditionnera les analyses ultérieures) et très long (il existe une grande diversité de matières premières).

3.2.3.2.2. *Identification des particules - modèle qualitatif*

Une étape importante de la technique proposée est évidemment l'identification des particules issues du broyage d'un aliment. Il n'est cependant pas nécessaire, dans le cadre de ce projet, de reconnaître chacune des matières premières constitutives d'un aliment, il suffit uniquement de déterminer si une particule est une particule de viande et d'os ou non.

L'identification d'une particule inconnue a été réalisée par analyse discriminante. L'analyse discriminante vise à classer un individu d'origine inconnue  $x$  dans un groupe  $G$  parmi  $k$  groupes différents. Cette affectation de l'individu à un groupe donné se fait sur base de  $p$  caractéristiques, c'est-à-dire de  $p$  variables, observées sur cet individu. A cet effet, une règle de classement  $R$  est établie à partir d'un échantillon  $g$  d'individus dont on connaît l'origine (voir Figure 21).

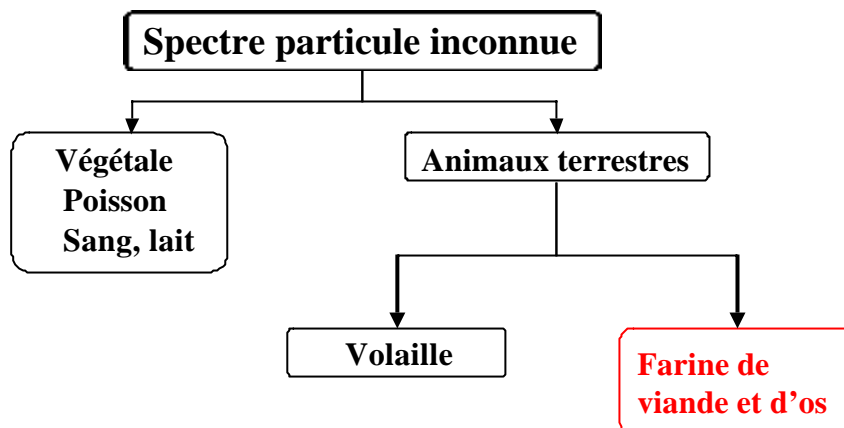


**Figure 21** : principe de l'analyse discriminante

Dans notre cas, l'individu inconnu  $x$  est une particule issue du broyage d'un aliment, les  $p$  variables observées sur cet individu sont les absorbances observées aux différentes



longueurs d'onde du spectre infrarouge de cet individu, et les échantillons d'individus dont on connaît l'origine sont des particules provenant de matières premières pures entrant dans la composition des aliments pour bétail. En réalité, l'identification des particules de viande et d'os a été réalisée en deux étapes (Figure 22).



**Figure 22** : Etapes de l'identification des particules de viande et d'os

Dans un premier temps, une particule inconnue est identifiée suivant sa provenance : animal terrestre ou non. Dans le premier cas, il s'agit de : farines de viande et d'os, farines de viande, sous-produits de volailles, farines de plumes. Ensuite, au sein des particules d'animaux terrestres, on sépare les particules provenant de volailles (et des sous-produits de volailles) et les particules de viande et d'os dont la présence est interdite dans les aliments pour bovins.

Les échantillons de matières premières utilisés pour construire les règles de discrimination ont été fournis principalement par le Ministère des Classes moyennes et de l'Agriculture ainsi que par deux producteurs d'aliments belges.

La liste des matières premières analysées est la suivante (le nombre d'échantillons analysés est donné entre parenthèses) : farine de viande et d'os (15), farine de viande (13), os broyés (4), sous-produits de volaille (6), farine de poissons (19), pois (6), manioc (6), blé (2), farine de sang (1), tourteau d'extraction de colza (3), maïs (3), glutenfeed de maïs (1), tourteau de germes de maïs (1), soja (5), lin (3), luzerne (4), sous-produits de lait (2).

### 3.2.3.2.3 Modèle quantitatif

L'objectif de cette analyse est de quantifier les farines de viande et d'os se trouvant dans un aliment composé. Cette quantification peut se faire sur base de l'identification des particules de cet aliment réalisée lors de l'analyse qualitative (voir ci-dessus). Des aliments composés avec des teneurs en farines de viande et d'os connues ont été utilisés pour construire et valider le modèle quantitatif. Pour construire le modèle, un aliment composé de base, non adultéré, et différentes farines de viande et d'os ont été soigneusement mélangés en différentes proportions (0 à 10 % de farine de viande). Environ 600 particules ont été choisies au hasard dans chacun des aliments artificiels fabriqués de la sorte et ont été analysées par microscopie proche infrarouge. Les particules analysées ont ensuite été classées, au moyen des règles de discrimination construites lors de l'analyse qualitative, dans le groupe des particules interdites

(particules de viande et d'os) ou dans le groupe des particules autorisées (autres particules), et, pour chaque échantillon, une image des particules analysées ayant été enregistrée, on a pu mesurer, par analyse d'image, la surface des particules en fonction de leur nature. Une régression linéaire a ensuite été établie entre la teneur des aliments en farine de viande et d'os et la surface relative des particules de viande et d'os dans l'aliment. La validation du modèle ainsi construit a été réalisée en analysant, suivant la même procédure que celle suivie lors de l'étape d'étalonnage, trois aliments composés indépendants.

Pour construire le modèle quantitatif, un aliment composé de base, préalablement broyé, non adultéré, fabriqué par une firme belge, et différentes farines de viande et d'os ont été soigneusement mélangés en différentes proportions (0 à 10 % de farine de viande). La composition de cet aliment de base est la suivante : palmiste, blé, lin, soya, citrus, cocotier, glutenfeed, radicelles, sons, minéraux, vitamines, CIAL (liant), mélasse.

Pour valider le modèle, trois aliments composés ont été utilisés. Le premier a été préparé par le Laboratoire d'Analyse de l'Etat à Tervuren et les deux autres ont été préparés par un producteur d'aliments belge. La teneur (en poids) en farine de viande et d'os de ces aliments varie de 2 à 6 %.

#### 3.2.3.2.4 Préparation de l'échantillon

Préalablement à l'analyse, les échantillons sont broyés avec un moulin Retsch (Allemagne) muni d'un tamis dont les mailles font 1mm.

#### 3.2.3.2.5 Analyse des échantillons et acquisition spectrale

Pour les matières premières, 30 particules choisies au hasard dans chacun des échantillons décrits ci-dessus ont été analysées par microscopie NIR. Pour les aliments composés, environ 600 particules ont été choisies au hasard dans chacun d'eux et ont été analysées par microscopie NIR. Les analyses ont été réalisées en réflexion sur des particules dispersées sur une surface de référence (spectralon) avec une fenêtre d'analyse de  $50\mu \times 50\mu$ . Les données ont été enregistrées sous forme de  $\text{Log } 1/R$  tous les 4 nm dans la région qui va de 1112 à 2500 nm, ce qui donne 348 longueurs d'onde par spectre. Chaque spectre de particule de matière première est la moyenne de 100 scans, et les spectres provenant de l'analyse d'aliments composés sont la moyenne de 10 scans.

#### 3.2.3.2.6 Traitement des données

Les données spectrales ont été traitées à l'aide du logiciel ISI (NIRS 3 ver. 4.0 et WinISI, INFRAISOFT INTERNATIONAL, Port Matilda, PA, USA). Les images des particules analysées ont été traitées à l'aide du logiciel Micro Image 3.0 (OLYMPUS OPTICAL CO., Hambourg, Europe).

Le traitement des données s'est fait de manière semblable pour la construction des deux règles de discrimination. La procédure suivie est la suivante :

- Premièrement, les spectres de particules des matières premières sont contrôlés visuellement et statistiquement afin détecter la présence éventuelle d'individus aberrants. Ces individus sont éliminés de la suite de l'analyse.

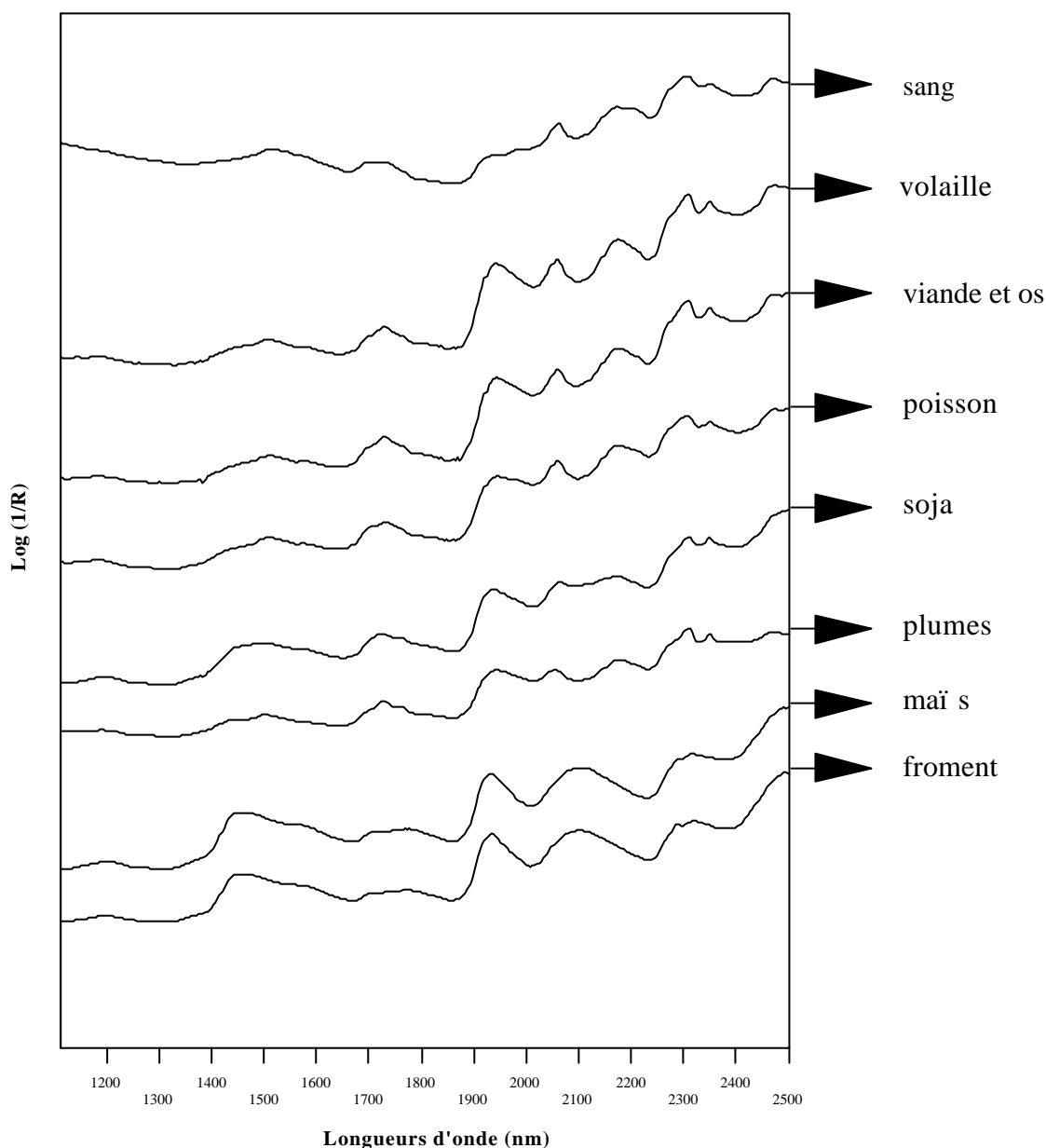
- Deuxièmement, les échantillons de matières premières sont répartis en deux groupes suivant leur nature et suivant la Figure 22.
- Troisièmement, dans chacun des deux groupes, on prélève aléatoirement 2/3 des échantillons pour construire la règle de discrimination et 1/3 pour valider cette règle.
- Quatrièmement, on construit la règle de discrimination. Le grand nombre de variables (348) observé sur chaque individu nécessite d'avoir recours à une technique de sélection des variables ou une technique d'extraction des variables afin de réduire le nombre de variables utilisées. La sélection des variables consiste à choisir parmi un grand nombre de variables un nombre plus restreint de variables en fonction de leur aptitude discriminante. L'extraction des variables consiste à utiliser l'ensemble initial de variables pour construire un nombre restreint de nouvelles variables synthétisant au mieux l'information contenue dans les variables d'origine. Cette solution a été retenue pour les deux règles de discrimination. Pour la première règle de discrimination, un réseau neuronal artificiel (réseau perceptron multicouches avec back propagation basé sur les scores PLS) a été utilisé pour discriminer les groupes représentés par une variable binaire prenant la valeur -1 pour le premier groupe et la valeur 1 pour le deuxième groupe. Pour la deuxième règle de discrimination, une régression PLS a été utilisée pour discriminer les groupes représentés par une variable binaire prenant la valeur 1 pour le premier groupe et la valeur 2 pour le deuxième groupe. A ce stade du traitement des données, divers traitements mathématiques des spectres bruts ont été testés afin d'optimiser les résultats.
- Cinquièmement, la règle construite est validée par le set d'échantillons indépendants de ceux qui ont servi à construire cette règle.

### 3.2.3.2.7 Résultats

#### *Caractéristiques spectrales*

Les caractéristiques spectrales des spectres moyens de particules provenant des matières premières les plus caractéristiques sont montrées dans la Figure 23. Des bandes d'absorption caractéristiques de l'eau sont observables à 1452 nm (OH first overtone) pour les matières premières végétales et à 1940 nm pour toutes les matières premières (OH second overtone). Le soya et les matières premières animales montrent des bandes d'absorption à 2312 et 2356 nm (combinaisons CH) dues à la présence de matières grasses et des bandes d'absorption à 2064 et 2184 nm (NH second overtone) dues à la présence de protéines tandis que le maïs et le blé montrent une bande d'absorption à 2100 nm (combinaisons OH) due à la présence d'amidon.

Il y a de grandes similitudes entre les spectres de farine de viande et d'os, de volaille, de plumes et de poisson. On peut difficilement différencier ces spectres à l'aide d'un simple examen visuel et le recours à la chimiométrie est indispensable si on veut distinguer ces matières premières.



**Figure 23** : Spectres moyens de particules de matières premières caractéristiques

#### *Analyse qualitative*

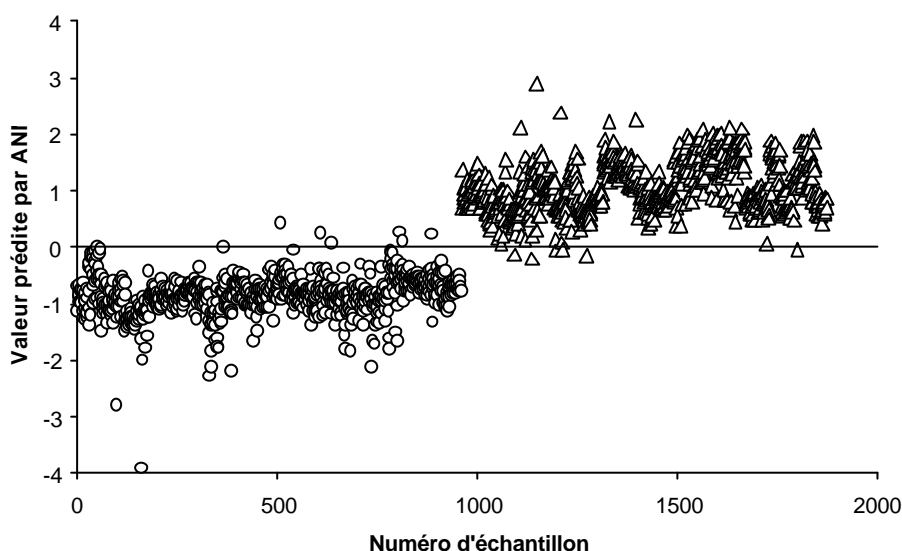
L'objectif de cette analyse est de pouvoir identifier une particule provenant du broyage d'un aliment comme étant une particule issue d'une matière première autorisée ou non.

Une première analyse discriminante prédictive, réalisée par réseau neuronal (ANN), est utilisée pour classer des particules inconnues dans deux groupes sur base de leurs absorbances entre 1112 nm et 2500 nm. Cette discrimination permet de déterminer si une particule provient d'un animal terrestre ou non. Plus de 3000 particules ont été analysées pour construire et pour valider la règle de discrimination. Le Tableau 6 montre les résultats de la validation de la règle de classement. Ces mêmes résultats sont visualisés dans la Figure 24 où les valeurs prédites par ANN pour chaque particule ont été reportées en face d'un numéro

d'ordre arbitraire. Les particules dont les valeurs prédites sont inférieures à 0 étant assignées au premier groupe et les particules dont les valeurs prédites sont supérieures à 0 étant assignées au second groupe. Préalablement à l'analyse neuronale, les données ont subi un traitement SNVD (Standard Normal Variate and Detrend) ainsi qu'une dérivée première de type 1,4,4,1.

**Tableau 6** : Validation de la première règle de discrimination

	Nombre de particules classées dans chaque groupe (%)		Total
	"pas animaux terrestres"	"animaux terrestres"	
Particules du groupe "pas animaux terrestres"	954 (99.37 %)	6 ( <b>0.63 %</b> )	960
Particules du groupe "animaux terrestres"	6 ( <b>0.66 %</b> )	906 (99.34 %)	912



**Figure 24** : Classification des particules de matières premières issues d'animaux terrestres ou non par réseau neuronal pour l'échantillon de validation. La ligne horizontale montre le seuil utilisé pour séparer les deux groupes dont les valeurs de référence sont -1 pour les particules ne provenant pas d'animaux terrestres et 1 pour les particules provenant d'animaux terrestres.  
Légende : O pas d'animaux terrestres, Δ animaux terrestres.

Le taux d'erreur général, estimé par l'échantillon de validation indépendant, est donné par :

$$\text{Taux d'erreur général} = (0.63 + 0.66)/2 = 0.64 \%$$

Une deuxième analyse discriminante permet de déterminer la nature exacte des particules identifiées comme provenant d'animaux terrestres. Parmi les particules d'animaux terrestres, on identifie d'une part les particules de volailles (sous-produits de volailles) et d'autre part les particules de viande et d'os qui sont les particules interdites pour l'alimentation des bovins. Une régression PLS a été utilisée pour discriminer les groupes représentés par une

variable binaire prenant la valeur 1 pour le premier groupe et la valeur 2 pour le deuxième groupe. Les particules dont les valeurs prédites sont inférieures à 1.5 étant assignées au premier groupe et les particules dont les valeurs prédites sont supérieures à 1.5 étant assignées au second groupe. Le Tableau 7 montre les résultats de la validation de la règle de classement.

**Tableau 7** : Validation de la deuxième règle de discrimination

	Nombre de particules classées dans chaque groupe (%)		Total
	"volaille"	"viande et os"	
Particules du groupe "volaille"	57 (95 %)	3 (5 %)	60
Particules du groupe "viande et os"	28 (13.5 %)	180 (86.5 %)	208

Le taux d'erreur général, estimé par l'échantillon de validation indépendant, est donné par :

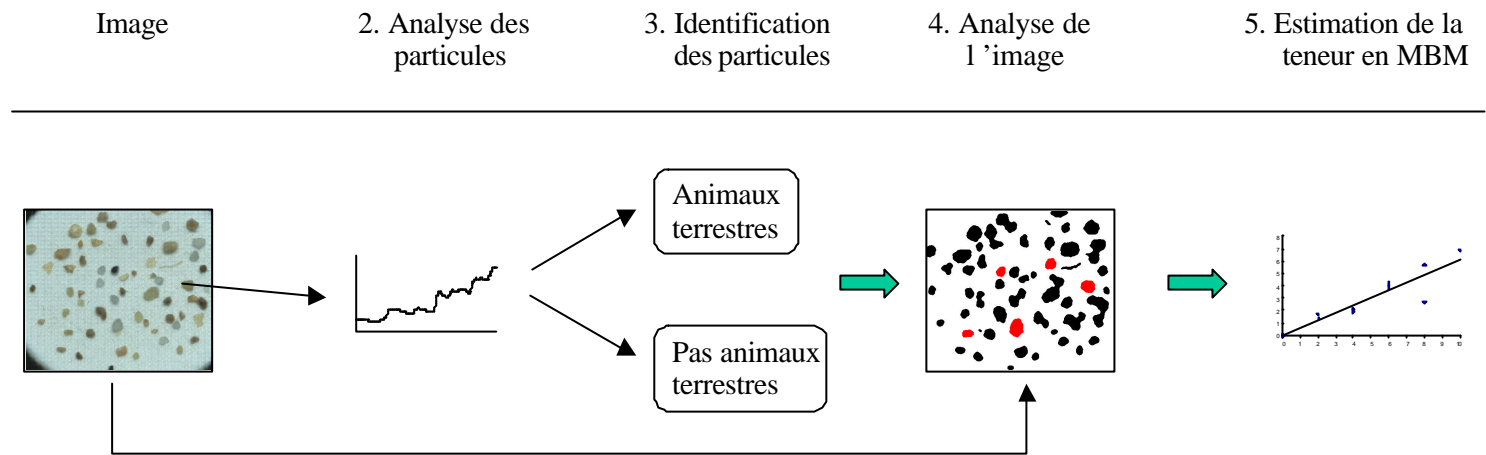
$$\text{Taux d'erreur général} = (5 + 13.5)/2 = 9.25 \%$$

#### Analyse quantitative

L'objectif de cette analyse est de quantifier les farines de viande et d'os se trouvant dans un aliment composé. Cette quantification peut se faire sur base de l'identification des particules de cet aliment réalisée lors de l'analyse qualitative (voir ci-dessus). Cependant, la discrimination permettant de distinguer les particules de volailles (sous-produits de volailles et farines de plumes) des particules de viande et d'os étant toujours en cours de développement, il a été décidé de n'utiliser que la première discrimination et de ne quantifier que les particules provenant d'animaux terrestres.

#### Etape de Calibration

Des aliments composés dont les teneurs en farines de viande et d'os sont connues ont été utilisés pour développer l'équation de calibration. Pour construire le modèle, un aliment composé de base, non adultéré, et différentes farines de viande et d'os ont été soigneusement mélangés en différentes proportions (0 à 10 % de farine de viande). Environ 600 particules ont été choisies au hasard dans chacun des aliments artificiels fabriqués de la sorte et ont été analysées par microscopie proche infrarouge. Les particules analysées ont ensuite été classées, grâce à la première règle de discrimination construite lors de l'analyse qualitative, dans le groupe des particules d'animaux terrestres ou non, et, pour chaque échantillon, une image des particules analysées ayant été enregistrée, on a pu mesurer, par analyse d'image, la surface des particules en fonction de leur nature. Ensuite une régression linéaire simple a été construite entre, d'une part, la teneur en MBM (Meat and Bone Meal = Farine de viande et d'os) des aliments artificiels et, d'autre part, la surface relative des particules de viande et d'os. La Figure 25 résume l'étape de calibration.

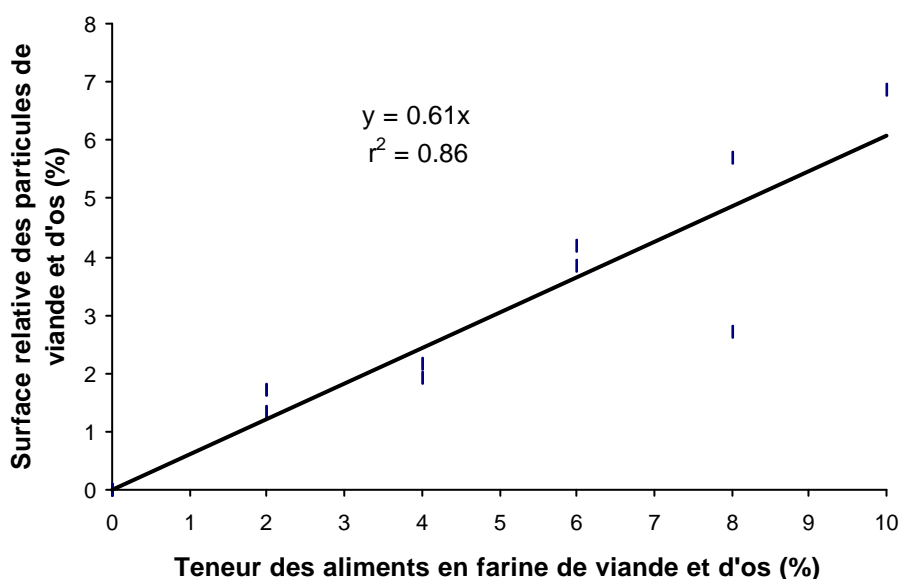


**Figure 25** : Analyse quantitative : étape de calibration (voir explications dans le texte)

Les résultats donnés dans le Tableau 8 et la Figure 26 montrent la relation entre la teneur des aliments en farine de viande et d'os et la surface relative des particules de viande et d'os dans l'aliment.

**Tableau 8** : Analyse quantitative. Résultats de l'étape de calibration

Numéro De l'échantillon	% MBM (poids) dans l'échantillon	Particules Analysées		Particules identifiées comme particules de viande et d'os			
		Nb	Surface	Nb	% nb	surface	% surface
0a	0	601		0	0	0	<b>0</b>
0b	0	600		0	0	0	<b>0</b>
2c	2	667	549327	12	1.80	9383	<b>1.71</b>
2d	2	627	599213	8	1.28	8102	<b>1.35</b>
4c	4	599	626755	13	2.17	11980	<b>1.91</b>
4d	4	604	649961	18	2.98	14011	<b>2.16</b>
6c	6	620	585088	19	3.06	22535	<b>3.85</b>
6d	6	634	549133	26	4.10	23081	<b>4.20</b>
8c	8	617	631854	36	5.83	36003	<b>5.70</b>
8d	8	618	542522	20	3.24	14764	<b>2.72</b>
10c	10	623	530410	45	7.22	36396	<b>6.86</b>



**Figure 26** : Proportion de farine de viande et d'os estimée par la surface relative des particules de viande et d'os détectées par microscopie NIR

*Etape de validation*

L'étape de validation consiste en l'analyse, suivant la même procédure que celle suivie lors de l'étape de calibration, de trois aliments composés indépendants dont les teneurs en farine de viande et d'os varient de 2 à 6 %. Les résultats sont donnés dans le Tableau 9. Ce Tableau permet de comparer les résultats obtenus par microscopie NIR à ceux obtenus par microscopie traditionnelle. En effet, les trois aliments analysés par



Microscopie-NIR ont également été analysés par de nombreux microscopistes traditionnels dans le cadre d'un ring-test organisé par le laboratoire de l'Etat de Tervuren<sup>①</sup>. La précision des résultats est évaluée par l'écart-type résiduel, qui est calculé de la manière suivante :

$$\text{écart-type résiduel} = \sqrt{\frac{1}{3} \sum (\text{valeur théorique} - \text{valeur estimée})^2}$$

La précision relative de la microscopie NIR est obtenue en divisant l'écart-type résiduel des microscopistes traditionnels par l'écart-type résiduel de la microscopie NIR.

**Tableau 9** : Analyse quantitative. Résultats de l'étape de validation et comparaison avec la méthode microscopique traditionnelle

Code échantillon	2a	3a	4a	Ecart-type Résiduel	Ecart-type résiduel microscopiste / Écart-type résiduel micro NIR
% théorique en mbm	2	6	6		
% estimé en mbm selon estimateur :					
Microscopiste 1	3.3	2.4	1.3	3.5	2.0
Microscopiste 2	3.2	4.6	0.4	3.4	2.0
Microscopiste 3	2	2	0.5	3.9	2.3
Microscopiste 4	1.01	1.13	1.05	4.0	<b>2.3</b>
Microscopiste 5	2.35	3.58	2.3	2.6	1.5
Microscopiste 7	2.1	2.81	0.75	3.5	2.0
Microscopiste 8	0.65	1.1	1.3	4.0	2.3
Microscopiste 10	4	2	2.13	3.4	2.0
Microscopiste 12	0.9	2.1	0.7	3.8	2.2
Microscopiste 14	1.28	1.02	1.15	4.0	2.3
Microscopiste 18	1.85	5.25	1.25	2.8	1.6
Microscopiste 20	*	5	*	*	*
Microscopiste 24	0.7	*	0.1	*	*
Microscopiste 25	1.6	4.5	2	2.5	<b>1.4</b>
Microscopiste NIR	2.02	4.57	3.36	1.7	

<b>Moyenne</b>	<b>2.0</b>
----------------	------------

### 3.2.3.2.8 Discussion

Les résultats de l'analyse discriminante entre les particules provenant de matières premières autorisées ou interdites pour nourrir les ruminants montrent qu'il est possible de détecter, au moyen de la microscopie NIR, les particules de viande et d'os dans un aliment composé broyé avec un taux de réussite supérieur à 99 %. Il faut cependant signaler que le modèle utilisé ne permet pas, actuellement, de différencier avec une telle précision les particules de viande bovine des particules de volaille.

① State Analysis Laboratory Tervuren (1998). Cooperative study « Control by microscopical examination of meat present in compound feedingstuffs ». CE, contractnumber VI/9198/97, 124 pages.

Les résultats de l'analyse quantitative des aliments composés contenant des farines de viande et d'os en proportions connues (Tableau 9) montrent qu'il est possible de quantifier les farines de viande et d'os dans un aliment avec une précision qui est, en moyenne, deux fois supérieure à celle obtenue par la méthode microscopique traditionnelle couramment adoptée. Cependant, même si ces résultats sont prometteurs, ils sont encore trop fragmentaires pour permettre de tirer des conclusions définitives.

Enfin, il faut noter que si la proportion de MBM dans un aliment composé est faible, il est nécessaire d'analyser un grand nombre de particules si on veut observer au moins une particule de MBM avec une probabilité élevée. Ainsi, par exemple, si un aliment contient 2 % de farine de viande et d'os et que l'on veut observer au moins une particule de MBM avec une probabilité de 95 %, il faut analyser environ 250 particules. Si un aliment contient 0.5 % de farine de viande et d'os, ce qui correspond à la limite maximale acceptable selon l'opinion du Comité Directeur Scientifique de l'UE, et que l'on veut observer au moins une particule de MBM avec une probabilité de 95 %, il faut analyser environ 1000 particules. L'analyse des particules se faisant une par une, l'analyse d'un tel nombre de particules allonge considérablement la durée totale de l'analyse.

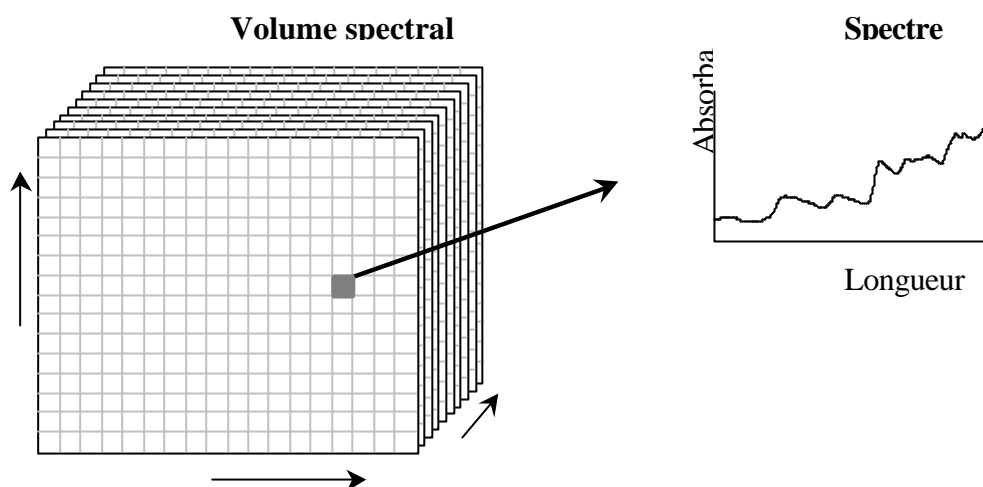
#### 3.2.3.2.9 Perspectives

La discrimination entre les particules de viande bovine et les particules de volaille doit être améliorée. Deux pistes sont actuellement envisagées pour y parvenir. Il semble important, d'une part, d'augmenter le nombre d'échantillons servant à construire la règle de classement afin de la rendre plus efficace. En effet, pour le moment, seulement 6 échantillons de sous-produits de volailles et 3 échantillons de farine de plumes ont été analysés. D'autre part, on pourrait envisager d'utiliser une plage d'analyse spectrale plus étendue (780 à 2500 nm ou 400 à 2500 nm) afin d'obtenir une information suffisante permettant de différencier les particules de viande bovine des particules de volaille (Thyholt *et al.*(1997) ; Murray (1998)).

L'analyse quantitative est réalisée, actuellement, par un modèle de régression reliant la proportion de farine de viande et d'os dans un aliment à la surface relative des particules de viande et d'os. Ce modèle pourrait être amélioré en faisant la différence, parmi les particules de viande et d'os, entre les particules de viande et les particules d'os. Cela permettrait de prendre en compte la différence de densité existant entre ces particules et, en conséquence, pourrait améliorer le modèle quantitatif.

L'analyse des particules se faisant actuellement une par une, l'analyse d'un grand nombre de particules allonge considérablement la durée totale de l'analyse. La solution envisagée pour remédier à ce problème consisterait à analyser toutes les particules en une seule fois grâce à la technique de l'imagerie spectrale. Plutôt que de collecter un seul spectre en un point de l'échantillon, l'imagerie spectrale permet d'enregistrer un volume spectral, encore appelé image hyper-spectrale, qui contient un spectre complet pour chaque point (c'est-à-dire chaque pixel) de l'image de l'échantillon (voir Figure 27). L'imagerie spectrale permet d'enregistrer simultanément une information spatiale et spectrale à partir de l'échantillon dans une matrice à trois dimensions appelée volume spectral. Le système de coordonnées de ce volume spectral est défini par  $x$ ,  $y$  et  $\lambda$ , où  $x$  et  $y$  sont les dimensions spatiales et  $\lambda$  est la longueur d'onde. Pour chaque combinaison de  $x$ ,  $y$  et  $\lambda$ , une valeur d'absorbance est enregistrée. Le volume spectral est obtenu en

prenant une image de l'échantillon à chaque longueur d'onde envisagée, la réunion de ces images permettant d'obtenir un spectre pour chaque pixel.



**Figure 27 :** Le volume spectral contient un spectre pour chaque pixel de l'image de l'échantillon

### 3.3 Contrôle de l'absence d'antibiotiques dans les aliments

#### 3.3.1 Introduction

Les prescriptions rencontrées dans les cahiers des charges des productions certifiées imposent l'absence totale d'alimentation antibio-complémentée. Les méthodes de détection actuellement mises en œuvre lors des contrôles ne permettent pas de déterminer la nature exacte de l'inhibiteur rencontré lors d'un résultat positif.

De nouvelles méthodes analytiques de type chromatographique sont actuellement de plus en plus développées. Cependant, la plupart de ces protocoles sont mis au point pour vérifier la teneur annoncée pour un antibiotique dans un aliment ou dans un prémix (Cutting *et al.*, 1997) et ne correspondent donc pas à l'analyse d'un résultat positif.

#### 3.3.2 Identification des interférences de différents paramètres de l'alimentation lors de la mise en évidence de la présence d'antibiotiques

##### 3.3.2.1 Détermination de l'action inhibitrice des aliments : méthode sur boîtes de Petri

###### 3.3.2.1.1 Principe de la méthode

L'action inhibitrice d'un aliment est mise en évidence par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition développée autour de l'échantillon à tester (aliment brut ou extrait aqueux/alcoolique) lors de la croissance de différentes souches bactériennes de référence. Les diamètres d'inhibition sont rapportés à une série d'antibiotiques considérés comme « standards ». Cette méthode est illustrée par les Photos n° 11 à 13.



Détection du pouvoir inhibiteur d'aliments sur milieu de Mueller-Hinton (pH 7) en présence de *Bacillus subtilis*



Détection du pouvoir inhibiteur d'extraits aqueux obtenus à partir d'aliments (Mueller-Hinton, pH 8 en présence de *Bacillus subtilis*)



Détection du pouvoir inhibiteur en présence de *Bacillus stearothermophilus* var. *Calidolactis*

**Photos n° 13, 14 et 15** : Détection du pouvoir inhibiteur par méthodes microbiologiques

L'utilisation de plusieurs souches (*Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* et *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*), de milieux à différents pH (milieu de Mueller-Hinton à pH 6, à pH 7 et à pH 8, milieu PCA à pH 8) et de plusieurs compléments biologiques (pénicillinase, acide *p*-aminobenzoï que, notamment) permet de cibler le groupe d'antibiotiques auquel peut appartenir l'inhibiteur.

3.3.2.1.2 Résultats

Une première série d'échantillons composée de matières premières a été analysée à l'état brut et sous forme d'extrait aqueux. Les résultats obtenus pour les échantillons bruts sont repris dans le Tableau 10.

**Tableau 10** : Pouvoir inhibiteur d'aliments bruts : mesure de la zone d'inhibition

	Milieu de Mueller-Hinton				PCA	PCA
	<i>B. subtilis</i>			<i>M. luteus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. stearo.</i>
	pH 6	pH 7	pH 8	pH 8	pH 8	
<i>Froment</i>	-	-	-	-	-	1 mm
Glutenfeed de froment (I)	-	-	-	-	-	-
Glutenfeed de froment (II)	-	-	-	-	-	-
<i>Rebulet de froment (I)</i>	2 mm	3 mm	-	-	-	3 mm
<i>Rebulet de froment (II)</i>	2 mm	2 mm	-	-	-	3 mm
<i>Remoulage de blé</i>	3 à 6 mm	3 à 4 mm	-	-	-	3 mm
Triticale	-	-	-	-	-	-
<i>Maïs 32 – 89</i>	2 mm	1 mm	1 mm	2-4 mm	-	1 mm
<i>Glutenfeed de maïs</i>	Bactériostatique		-	-	2 mm	4 mm
Farine fourragère de maïs (10 % MG)	-	-	-	-	-	-
Radicelles de malt	-	-	-	-	-	-
<i>Farine de luzerne déshydratée (I)</i>	-	-	-	-	-	3 mm
Farine de luzerne déshydratée (II)	-	-	-	-	-	-
<i>Farine de luzerne déshydratée (III)</i>	-	-	-	-	-	3 mm
Pulpes séchées de betteraves	-	-	-	-	-	-
Grains de soja (I)	-	-	-	-	-	-
Grains de soja (II)	-	-	-	-	-	-
Tourteaux de soja (extraction)	-	-	-	-	-	-
Tourteaux de colza (extraction)	-	-	-	-	-	-
Tourteaux de tournesol (extraction)	-	-	-	-	-	-
Tourteaux de lin (extraction)	-	-	-	-	-	-
<i>Schilfers de lin (I)</i>	-	-	-	-	-	3 mm
<i>Schilfers de lin (II)</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Schilfers de palmiste</i>	2 mm	2 mm	-	-	-	3 mm
<i>Schilfers de cocotier 10 % MG</i>	-	2 mm	-	-	-	-
Farine de plumes déshydratées	-	-	-	-	-	-
Bone I	-	-	-	-	-	-
Bone II	-	-	-	-	-	-
<i>Bone III (pellets)</i>	-	-	-	-	-	2 mm
<i>Bone IV (pellets)</i>	-	-	-	-	-	4 mm
<i>Bone V</i>	-	-	-	-	-	1 mm
<i>Bone VI</i>	-	-	-	-	+	1 mm

**Tableau 10** : Pouvoir inhibiteur d'aliments bruts : mesure de la zone d'inhibition

	Milieu de Mueller-Hinton			PCA	PCA
	<i>B. subtilis</i>		<i>M. luteus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. stearo.</i>
	pH 6	pH 7	pH 8	pH 8	
<i>Hydrolised</i>	-	2 mm	+	-	-
Farine de viande – osseuse	-	-	-	-	-
<i>Farine de sang</i>	15 mm	5 mm	10 mm	3 mm	10 mm
<i>Viande</i>	-	-	-	-	3 à 4 mm
Fish I	-	-	-	-	-
Fish II	-	-	-	-	-
Lactosérum acide	-	-	-	-	-

Les résultats obtenus pour les extraits aqueux confirment la plupart des résultats obtenus sur aliment brut. Certains extraits provenant d'un aliment brut qui ne présente pas de pouvoir inhibiteur, laissent cependant apparaître une zone d'inhibition, c'est le cas notamment pour la farine de luzerne déshydratée (II) [diamètre de 2 mm sur *B. subtilis*, pH 8], les schilfers de lin (II), la farine de plumes, le Bone VI et « *Hydrolised* », ces derniers marquant sur *B. stearotherophilus* var. *calidolactis*.

Ces premiers résultats indiquent la présence d'agents inhibiteurs dans plusieurs matières premières. L'analyse des extraits aqueux, en vue d'isoler ce pouvoir inhibiteur, a été effectuée après filtration sur filtre papier (Schleicher & Schuell 589<sup>1</sup>). Le pouvoir inhibiteur disparaît après filtration. L'analyse sur filtre en fibres de verre devra permettre la suppression d'une série d'interactions entre certains composés et la cellulose du papier : seules les particules seront retenues sur le filtre en fibres de verre.

### 3.3.2.2 Détermination de l'action inhibitrice des aliments : méthode par turbidimétrie

#### 3.3.2.2.1 Principe de la méthode

La turbidimétrie est une méthode qui est utilisée pour mettre en évidence la présence de monensine (antibiotique utilisé comme facteur de croissance). L'activité antibiotique est mise en évidence par la mesure de la transmission de la lumière à travers un milieu ensemencé par une souche de référence. La transmission de la lumière est une fonction de la concentration de l'antibiotique. Pour la détermination de la monensine, la souche utilisée est *Enterococcus hirae*.

Le principe de mesure de la transmission de la lumière à travers un milieu de culture a été appliqué à d'autres souches (*Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* et *Bacillus stearotherophilus* var. *calidolactis*). En effet, la sensibilité du test de détection est généralement plus grande lorsque ce test est effectué par méthode de diffusion dans le milieu (par rapport à la diffusion sur boîte de Petri).

L'intérêt d'une telle méthode réside principalement dans le fait que les lectures se font de manière objective, par l'utilisation d'un lecteur de microplaques (BIO-RAD,

Novapath™,  $\lambda_{\text{référence}}$  : 655 nm,  $\lambda_{\text{mesure}}$  : 595 nm). Un des inconvénients concerne l'analyse exclusive d'extraits aqueux ou alcooliques.

#### 3.3.2.2.2 Résultats

Les premiers résultats obtenus avec cette méthode microbiologique nous permettent d'envisager une étape de sélection des échantillons plus rapide que la diffusion sur boîte de Petri, la lecture étant obtenue au bout de 4 heures à 4 heures 30 de manière automatique. Les paramètres d'influence pour ce test turbidimétrique seront développés lors du prochain semestre.

La première étape de cette méthode a consisté à évaluer la croissance des souches utilisées comme référence durant une période relativement réduite (de l'ordre de 4 à 5 heures). Au bout de cette période d'incubation, la mesure de la densité optique du milieu augmente fortement et indique la croissance de la souche.

La seconde étape d'analyse par turbidimétrie a été l'évaluation de la méthode sur des échantillons d'aliments dopés et non dopés. L'utilisation de ce type de méthode impose, lors de l'analyse, l'ajout d'un extrait parfaitement transparent. Il faut donc extraire, au départ de l'aliment, les substances susceptibles d'inhiber la croissance de la souche témoin. Les solvants d'extraction utilisés doivent être éliminés afin d'éviter toute interférence due à leur présence.

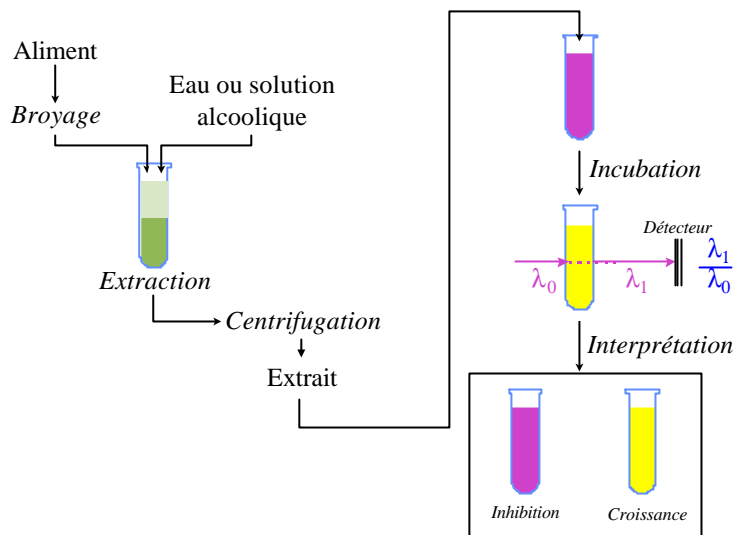
Les solvants d'extraction envisagés ont été l'eau et l'éthanol. Les extraits obtenus lors de ces manipulations n'ont pas permis d'utiliser la turbidimétrie pour suivre l'évolution de la densité optique en fonction de la croissance de la souche témoin. En effet, l'extraction de nombreux pigments présents dans les aliments a rendu la mesure impossible, malgré l'utilisation de différentes combinaison de longueurs d'onde disponibles sur le lecteur de microplaques.

La turbidimétrie a été abandonnée au profit d'une autre technique permettant de suivre l'évolution de la croissance de souches bactériennes : méthode par diffusion en milieu liquide avec suivi de l'acidification du milieu lors de la croissance de la souche. Cette technique est déjà utilisée dans le domaine laitier pour déceler la présence d'antibiotiques dans les productions laitières.

#### 3.3.2.3 Détermination de l'action inhibitrice des aliments : méthode par diffusion en milieu liquide

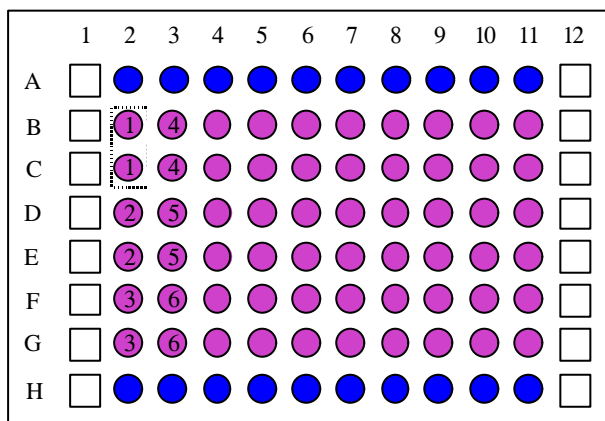
##### 3.3.2.3.1 Principe de la méthode

La mise en évidence de substances inhibitrices repose sur la croissance d'un organisme bactérien de référence, *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*, dans un milieu liquide. La croissance bactérienne se traduit par la production d'un acide. Un indicateur de pH (pourpre de bromocrésol, BCP) ajouté au milieu permet de suivre l'évolution de l'acidification. L'absence de substances inhibitrices dans l'extrait analysé permet la croissance de la souche et donc l'acidification du milieu de croissance. La Figure 28 schématise le protocole analytique développé.



**Figure 28 :** Détermination de l'action inhibitrice des aliments – Schéma analytique développé

Le suivi de l'acidification du milieu se fait par lecture optique afin d'objectiver l'interprétation des résultats. Pour l'interprétation de cette lecture, les résultats sont calculés en « pourcentage de croissance » par rapport à un milieu ne contenant que la souche bactérienne (milieu liquide ensemencé ne contenant pas d'extrait).



Les colonnes 1 et 12 ( □ ) contiennent essentiellement le milieu.

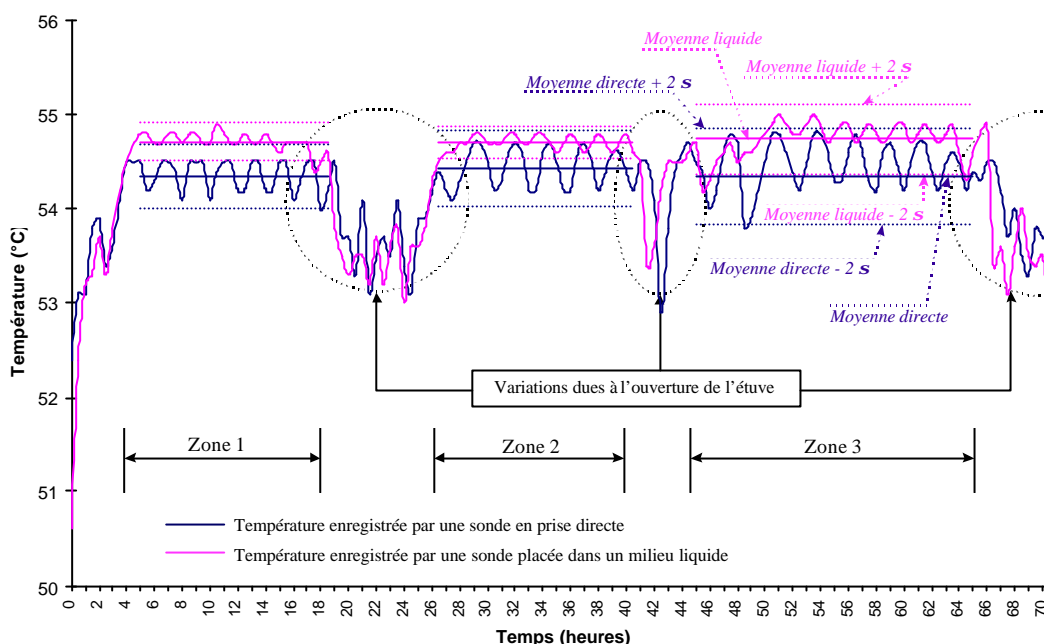
Les lignes A et H ( ● ) contiennent le milieu ensemencé.

Les autres puits ( ● ) contiennent le milieu ensemencé additionné de l'extrait.

**Figure 29 :** Répartition des échantillons sur les microplaques

La Figure 29 représente la répartition des puits sur les microplaques utilisées. Les analyses sont réalisées sur microplaques car ce système permet la détermination simultanée d'une trentaine d'échantillons (détermination effectuée en double).





**Figure 30** : Contrôle de la stabilité de l'étuve ( $55^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ )

Une première série d'analyses a été effectuée afin de vérifier que les conditions d'incubation (étuve réglée à  $55^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) étaient identiques sur l'ensemble de la microplaque. Pour ce faire, nous avons alterné les colonnes : les colonnes paires contenaient le milieu seul et les colonnes impaires contenaient le milieuensemencé. Les résultats obtenus permettent d'utiliser la répartition donnée ci-dessus, la croissance étant homogène partout. La Figure 30 illustre le contrôle de la stabilité de l'étuve utilisée. Les courbes obtenues montrent que l'inertie thermique est plus élevée pour le milieu liquide, auquel le milieu de culture utilisé peut être assimilé, ce qui se traduit par une plus grande résistance aux variations de température. Les différentes moyennes ont été calculées par zone, en ne tenant pas compte des ouvertures de l'étuve.

Le Tableau 11 reprend pour chaque zone définie, les valeurs calculées pour la moyenne, ainsi que pour la moyenne  $\pm 2 \sigma$ . Deux moyennes supplémentaires ont été calculées : la moyenne globale sur la durée totale de mesure en intégrant les variations dues aux ouvertures de l'étuve (*Globale 1*) et la moyenne globale sur la durée totale de mesure en supprimant les variations dues aux ouvertures de l'étuve (*Globale 2*).

**Tableau 11** : Valeurs moyennes obtenues lors du contrôle de la stabilité thermique de l'étuve ( $^{\circ}\text{C}$ )

	Zone 1	Zone 2	Zone 3	Globale 1	Globale 2
Moyenne directe	54.4	54.4	54.3	54.4	54.7
Moyenne directe + 2 $\sigma$	54.7	54.8	54.9	55.3	55.0
Moyenne direct - 2 $\sigma$	54.0	54.0	53.8	53.5	54.4
Moyenne liquide	54.7	54.7	54.7	54.2	54.4
Moyenne liquide + 2 $\sigma$	54.9	54.9	55.1	55.5	54.9
Moyenne liquide - 2 $\sigma$	54.5	54.5	54.4	52.9	54.0

Les résultats obtenus lors de la lecture des microplaques sont donnés en absorbance. Ils fournissent donc une information sur l'évolution de la coloration du milieu (l'acidification se traduit par un jaunissement de l'indicateur de pH) beaucoup plus sensible qu'une simple lecture visuelle, dépendant de l'opérateur, de l'éclairage et d'autres paramètres trop subjectifs. Le Tableau 12 reprend les conditions de lecture.

**Tableau 12 :** Conditions de lecture des microplaques

Lecteur : Microplate Reader Novapath™ Bio-Rad	
Impression des rapports	Oui
Données en absorbance	Oui
Limite supérieure	3.000
Limite inférieure	0.000
Lecture en double longueur d'onde	Oui
Longueur d'onde de référence	655 nm
Longueur d'onde de mesure (1)	405 nm
Longueur d'onde de mesure (2)	450 nm
Automixing	Oui
Time delay	Non
Absorbance delay	Non
Multiplés lectures	Non

L'interprétation des résultats obtenus lors des analyses effectuées doit permettre de supprimer l'influence de la préparation du milieu, de la densité d'ensemencement et de l'incubation. Différents paramètres sont calculés sur base de la répartition des échantillons sur les microplaques (Figure 29). Le premier paramètre indispensable (*équation 1*) correspond au calcul de la moyenne des blancs (milieu nonensemencé, colonne 1 et colonne 12). Lors du calcul de cette moyenne, certaines valeurs aberrantes peuvent être éliminées, elles correspondent à un puits où l'évaporation du milieu aurait été plus importante (mauvaise étanchéité du film de protection), à un puits où une contamination serait intervenue lors des manipulations de la microplaque, entraînant une coloration plus intense du milieu. La seconde moyenne (*équation 2*) à calculer correspond aux valeurs résultant de la croissance de la souche témoin dans un milieu exempt de sulfamides (ligne A<sub>2</sub>-A<sub>11</sub> et ligne H<sub>2</sub>-H<sub>11</sub>). Pour ce calcul aussi, les valeurs aberrantes sont éliminées.

$$\overline{\text{Abs.}}_{\text{milieu}} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \text{Abs.}_i \quad (\text{équation 1})$$

Où **Abs<sub>milieu</sub>** représente la moyenne des différentes absorbances obtenues pour le milieu nonensemencé, **n** le nombre d'absorbances prises en compte dans le calcul ( $8 \leq n \leq 16$ ) et **Abs<sub>i</sub>** les absorbances individuelles.

$$\overline{\text{Abs.}}_{\text{souche}} = \frac{1}{v} \sum_{j=1}^v \text{Abs.}_j \quad (\text{équation 2})$$

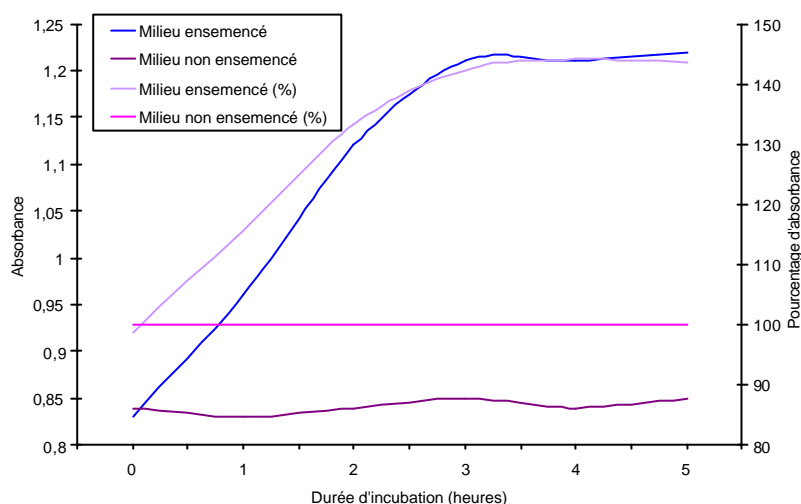
Où **Abs<sub>souche</sub>** représente la moyenne des différentes absorbances obtenues pour le milieuensemencé, **v** le nombre d'absorbances prises en compte dans le calcul ( $10 \leq v \leq 20$ ) et **Abs<sub>j</sub>** les absorbances individuelles.

La valeur moyenne obtenue pour le milieu ensemencé va être utilisée comme référence pour les autres mesures, et ce au cours du temps. Les absorbances obtenues pour les différents échantillons (zone B<sub>2</sub>-G<sub>11</sub> - Figure 29) vont être rapportées à 100 % de la moyenne (équation 3). Lorsque plusieurs mesures sont effectuées pour un même échantillon, une valeur moyenne (moyenne échantillon) est alors calculée, cette valeur moyenne servant lors des interprétations ultérieures.

$$\% \text{ d'abs. de l'échantillon } i = \frac{\text{Abs.éch.}_i}{\text{Abs.}_{\text{souche}}} * 100 \quad (\text{équation 3})$$

Où Abs.éch.<sub>i</sub> représente la valeur de l'absorbance obtenue pour le i<sup>ème</sup> échantillon.

La mise en graphique de ces résultats (% d'absorbance en fonction du temps d'incubation écoulé) permet de suivre l'évolution de la croissance microbienne. La Figure 31 illustre cette évolution en comparant l'acidité dans un milieu non ensemencé et dans un milieu ensemencé (absorbance brute et absorbance relative en pourcentage du milieu non ensemencé).



**Figure 31** : Evolution de l'acidification du milieu de culture en fonction du temps

L'équation 3 est applicable dans le calcul du pourcentage d'absorbance à condition que les milieux ne présentent pas, au temps t=0, de différences significatives entre eux. En effet, l'analyse d'un extrait plus ou moins foncé va perturber les lectures si les valeurs ne sont pas corrigées en fonction de cette différence initiale. L'équation 4 prend en compte ce facteur correctif.

$$\% \text{ d'abs.}_t \text{ de l'échantillon } i = \frac{\text{Abs.}_0 \text{éch.}_i * \text{Abs.}_t \text{éch.}_i}{\text{Abs.}_{\text{milieu}} * \text{Abs.}_{\text{souche}}} * 100 \quad (\text{équation 4})$$

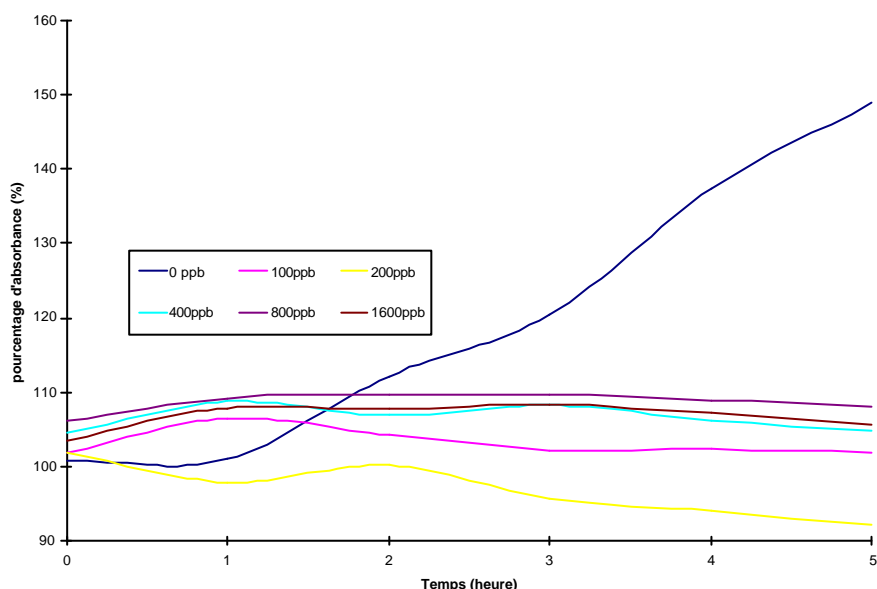
où Abs.<sub>t</sub>éch.<sub>i</sub> représente la valeur de l'absorbance obtenue pour le i<sup>ème</sup> échantillon au temps t, Abs.<sub>0</sub>éch.<sub>i</sub> l'absorbance initiale du même échantillon, Abs<sub>milieu</sub> l'absorbance moyenne obtenue pour le milieu au temps t=0 et Abs<sub>souche</sub> l'absorbance moyenne obtenue pour le milieu ensemencé au moment t.

### 3.3.2.3.2 Résultats

Une série de 8 sulfamides (sulfamérazine, sulfaméthazine, sulfadiméthoxine, sulfaméthoxazole, sulfaméthizole, sulfadiazine, sulfameter, sulfanilamide) seront étudiés d'un point de vue détection microbiologique.

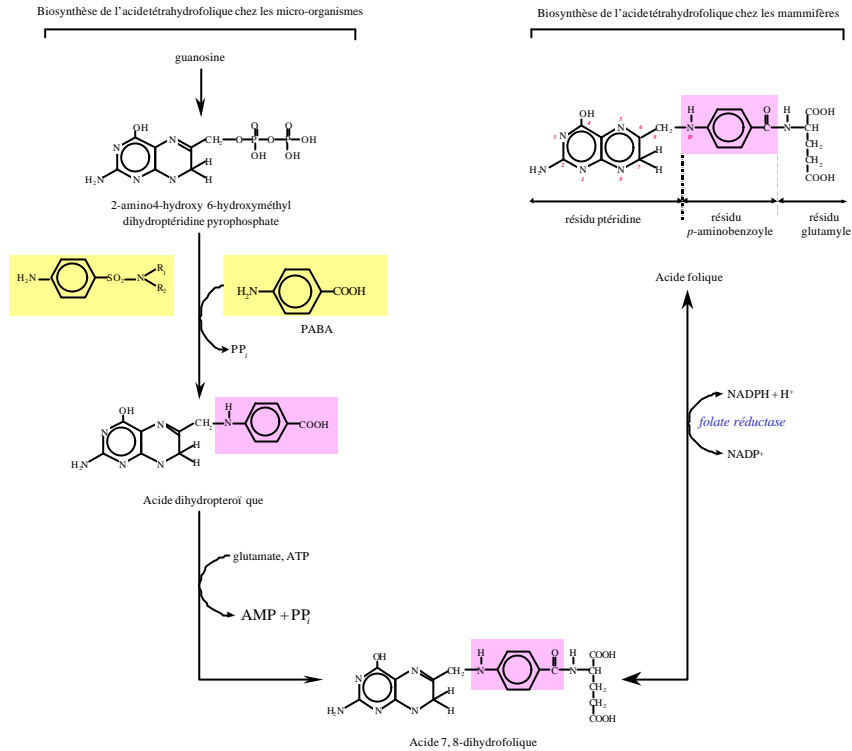
Avant l'étude sur aliments dopés, une première analyse a été effectuée sur solutions. Ces dernières contiennent les sulfamides à des teneurs comprises entre 0 et 1.600 µg/kg (ppb). La Figure 32 présente l'évolution du pourcentage d'absorbance rapporté au blanc obtenu pour un bouillon dopé à la sulfaméthazine. Les allures des courbes obtenues pour les autres sulfamides sont semblables.

Dans cet essai, l'acide *p*-aminobenzoï que (*p*-ABA) n'est pas ajouté. Cet acide permet la mise en évidence de sulfamides. En effet, l'action de ces antibactériens joue au niveau de la synthèse de l'acide folique, dont le *p*-ABA est un précurseur, par action antibiomimétique (Figure 33).



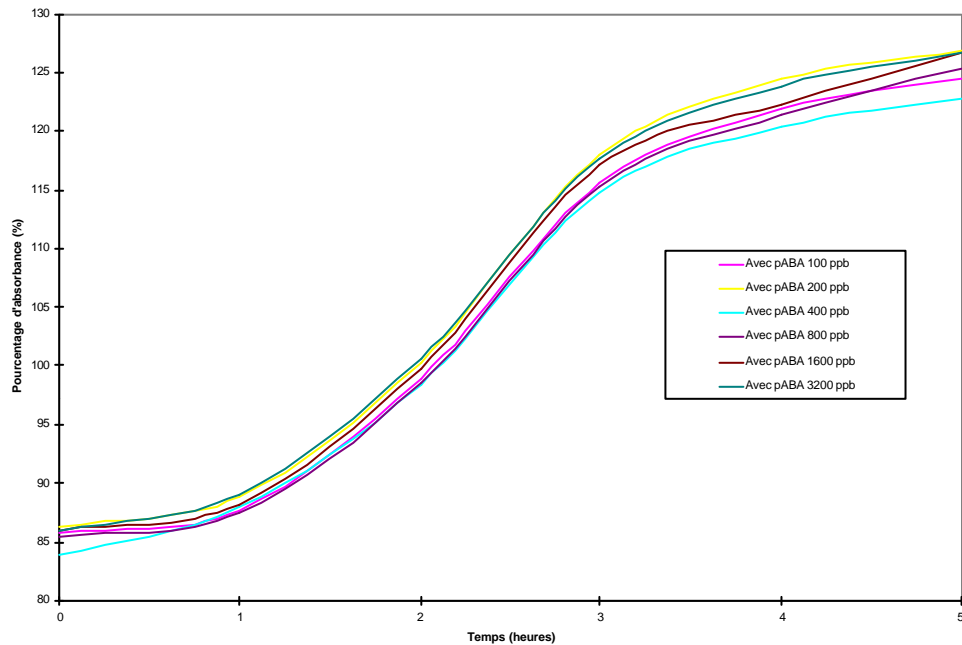
**Figure 32 :** Évolution du % d'absorbance (rapporté au blanc) du bouillon dopé à la sulfaméthazine ( $\lambda = 405$  nm - sans ajout de *p*-ABA)

Les résultats obtenus sur ces solutions montrent que, seul le banc (bouillon non dopé) présente une évolution de la coloration du milieu. La souche est donc bien inhibée à des teneurs comprises entre 100 et 1.600 ppb de sulfaméthazine.



**Figure 33 :** Mode d'action des sulfamides (Encyclopedia Universalis)

Le même essai mené en présence de *p*-ABA (Figure 34) montre la levée de l'inhibition due aux sulfamides. Toutes les courbes, quelle que soit la teneur en sulfaméthazine, présentent la même allure et sont pratiquement confondues.



**Figure 34 :** Évolution du % d'absorbance (rapporté au blanc) du bouillon dopé à la sulfaméthazine ( $\lambda = 405 \text{ nm}$  - en présence de *p*-ABA)

Le Tableau 13 présente la sensibilité de la souche de *B. stéarotherophilus* var. *calidolactis* utilisée lors de nos tests et ce, pour deux concentrations en microorganismes.

**Tableau 13** : Sensibilité de la souche de *B. stéarotherophilus* var. *calidolactis* utilisée vis à vis des sulfamides étudiés

	Concentration en <i>B. stearotherophilus</i> var. <i>calidolactis</i>	
	10 <sup>7</sup> cellules/ml	10 <sup>6</sup> cellules/ml
Sulfaméthazine	100 ppb	100 ppb
Sulfamérazine	800 ppb	400 ppb
Sulfaméthizole	400 ppb	100 ppb
Sulfadiméthoxine	100 ppb	100 ppb
Sulfameter	800 ppb	400 ppb
Sulfanilamide	non détecté	800 ppb
Sulfaméthoxazole	non détecté	3.200 ppb

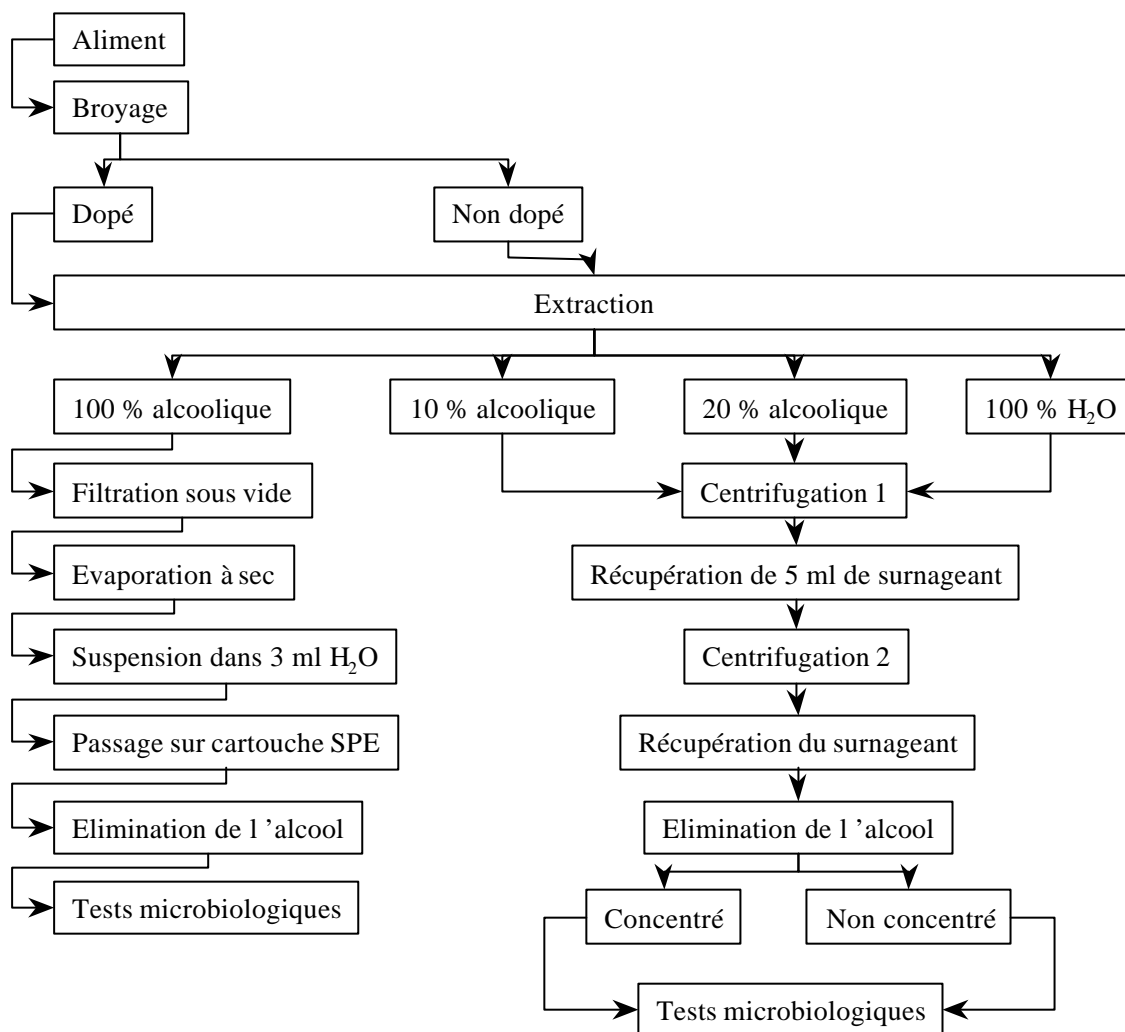
Les résultats repris dans ce Tableau indiquent que la concentration en souche est importante pour la sensibilité du test. Cette concentration sera fixée à 10<sup>6</sup> cellules/ml, ce qui correspond à environ 18 heures d'incubation pour la solution mère.

Cette première série d'essais a porté sur des solutions de sulfamides. La seconde série d'essai a porté sur des solutions obtenues après extraction à partir d'aliments dopés aux sulfamides.

#### 3.3.2.4 Étude des échantillons dopés

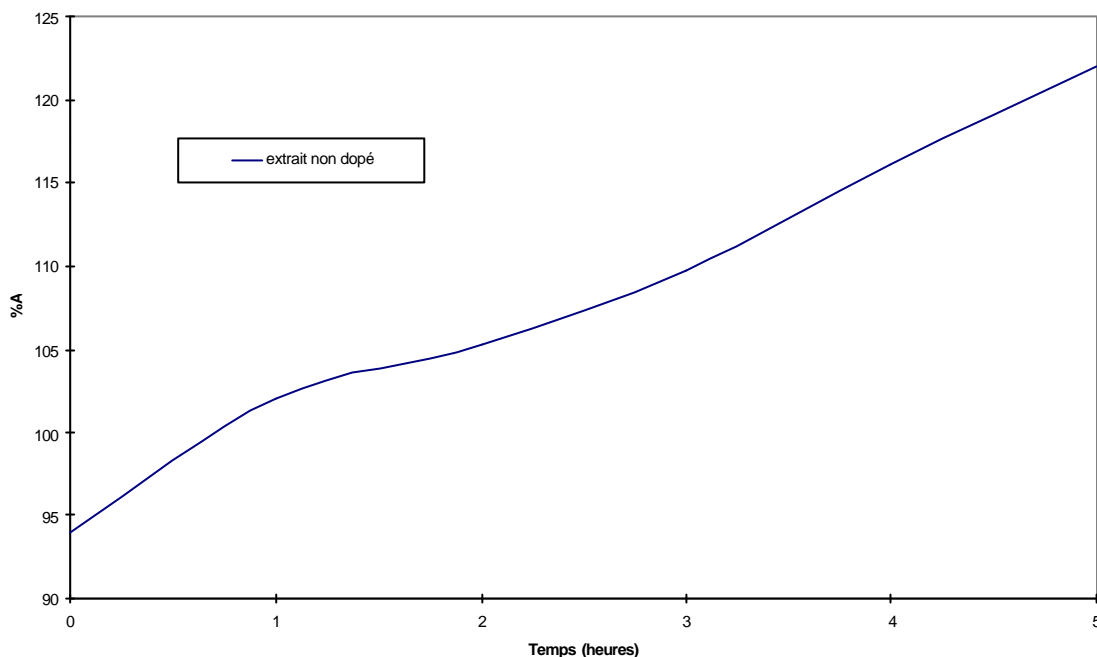
La préparation des échantillons dopés comporte deux étapes : la préparation des différents constituants utilisés comme aliment de référence et le dopage de ce mélange par des solutions de sulfamides. Le choix de doper les aliments au moyen d'une solution de sulfamides se justifie par les quantités minimales de matière à peser : pour doper les aliments à une teneur de 1 ppm (1 mg/kg), il fallait peser 100 mg de matière active (sulfamides) à disperser de manière homogène dans 100 kg d'aliment, prélever une aliquote de cet aliment et réaliser l'extraction sur cette aliquote. Il est bien sûr impossible de réussir une telle manipulation.

La Figure 35 illustre les différentes étapes nécessaires à la préparation des échantillons en vue de leur analyse par tests microbiologiques.



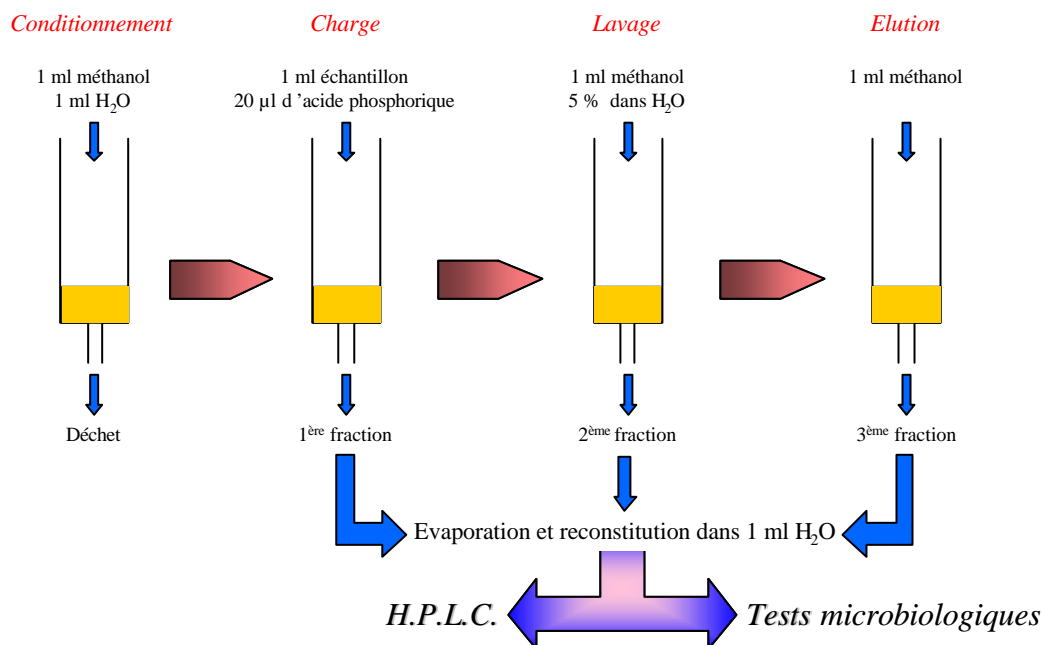
**Figure 35 :** Préparation des échantillons en vue de leur analyse par tests microbiologiques

La mise en évidence des sulfamides repose sur l'utilisation de l'acide *p*-aminobenzoïque (*p*-ABA). Les tests microbiologiques comprendront donc deux analyses : en l'absence et en présence du *p*-ABA.



**Figure 36 :** Evolution du % d'absorbance (/ blanc) de l'extrait non dopé, centrifugé et non concentré ( $\lambda = 405 \text{ nm}$ )

Les résultats obtenus sur l'aliment non dopé (Figure 36) montre que celui-ci n'est pas inhibiteur vis à vis de la souche utilisée.



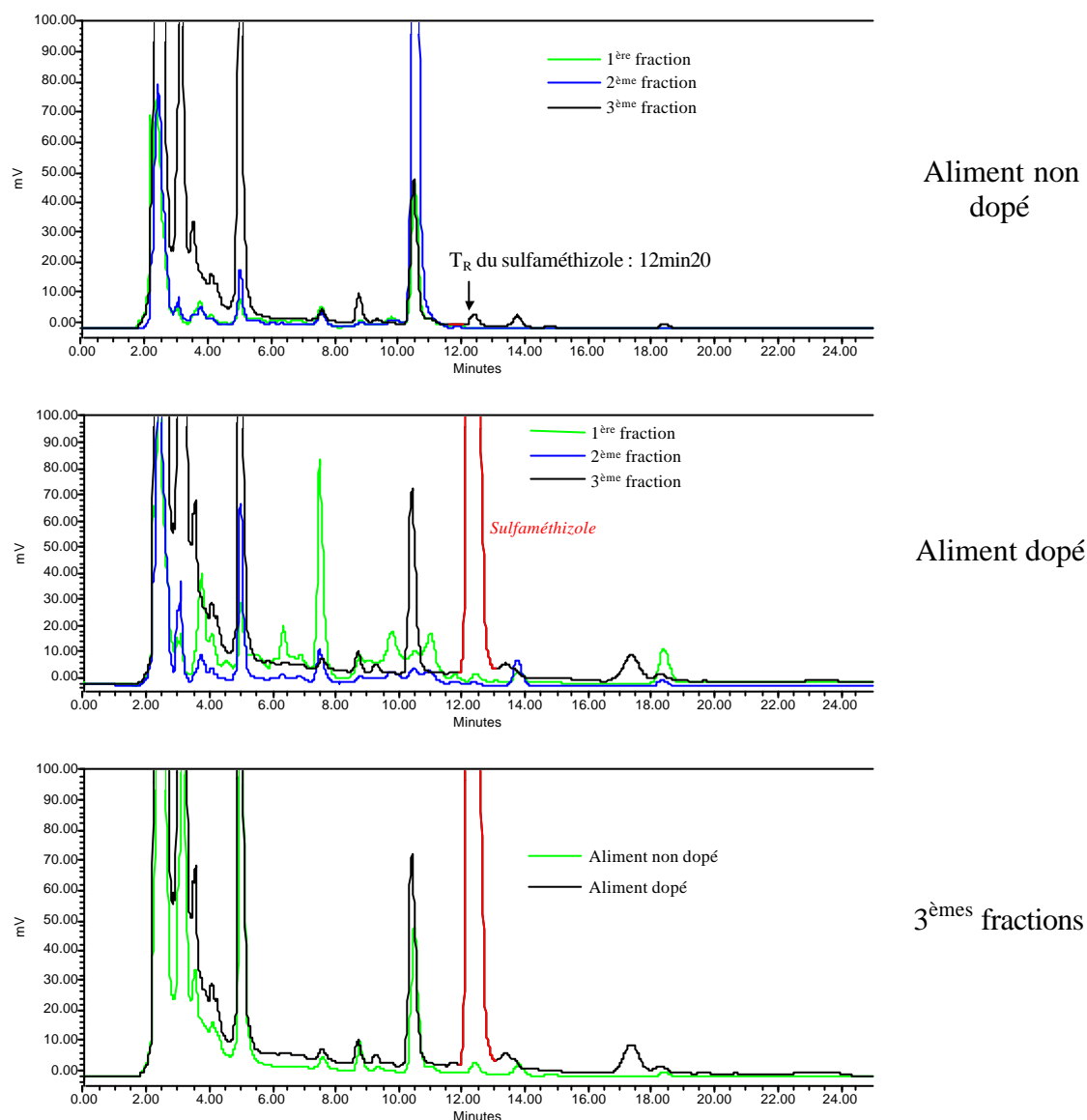
**Figure 37 :** Protocole de purification sur colonne Oasis™ HLB – Waters

Le même aliment, dopé à 1 ppm de sulfaméthizole, a été soumis à une extraction alcoolique. Aucun extrait n'a présenté d'inhibition sur la souche test. Ces extraits ont donc été concentrés. Après concentration, l'ajout de *p*-ABA n'a pas pu lever l'inhibition obtenue. L'extrait contient des substances à de telles concentrations que



leur présence inhibe la croissance de la souche, interdisant ainsi la mise en évidence des sulfamides.

Une purification sur colonne d'extraction (Oasis™ HLB - Waters) a été envisagée afin d'éliminer le pouvoir inhibiteur interférant. La Figure 37 reprend les différentes étapes de purification et les fractions ainsi obtenues.



**Figure 38** : Comparaison des chromatogrammes obtenus après passage sur colonne Oasis™ HLB de l'extrait alcoolique

La purification n'a pas permis d'éliminer les substances interférentes. Les différentes fractions ont cependant été injectées en HPLC (cfr Tâche C.2.2.) afin de vérifier la présence ou l'absence de sulfaméthizole. La Figure 38 compare les chromatogrammes obtenus successivement pour l'aliment non dopé (fractions 1, 2 et 3), pour l'aliment dopé à 1 ppm de sulfaméthizole (fractions 1, 2 et 3) et les deux fractions 3.

La comparaison entre les deux fractions de collecte (3<sup>ème</sup> fraction - Figure 38) montre que le sulfaméthizole est bien identifiable après dopage et extraction d'un échantillon.

En conclusion, le protocole développé pour la mise en évidence des sulfamides dans les aliments par méthode microbiologique ne permet pas cette mise en évidence car les extraits obtenus contiennent d'autres substances interférant dans le test microbiologique. Les purifications envisagées sur colonne Oasis<sup>TM</sup> HLB n'améliorent pas les résultats. Par contre, le protocole simple développé permet la préparation des échantillons pour l'injection en chromatographie liquide haute performance (HPLC).

### 3.3.2.5 *Étude des échantillons positifs lors des tests microbiologiques*

La présence de nombreux résultats positifs (présence d'inhibition lors de tests microbiologiques) laisse supposer que les matières premières analysées contiennent d'autres substances susceptibles de donner des résultats semblables aux antibiotiques. Si on se réfère au Tableau 8, on remarque que les denrées d'origine céréalière présentent des zones d'inhibition importantes. Deux études seront menées afin de déterminer l'origine de cette inhibition. La première piste comprend l'analyse microbiologique des contaminants présents sur ces denrées et la seconde correspond à l'étude des composants d'origine céréalière potentiellement inhibiteurs sur les souches tests.

#### 3.3.2.5.1. *Analyse microbiologique des aliments positifs*

Le but de cette analyse est d'isoler certaines souches contaminantes capables de produire un effet inhibiteur lors du test de mise en évidence des antibiotiques. L'isolement de ces souches est réalisé en plusieurs étapes :

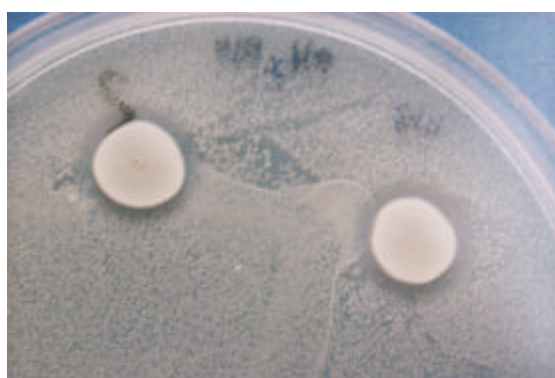
- √ mise en évidence de la flore contaminante mésophile totale (mise en suspension de 1 gramme de matière dans 9 ml d'eau de ringer stérile, étalement de cette suspension sur une gélose PCA et incubation à 37°C durant 48 heures)
- √ isolement des souches contaminantes (prélèvement et épuisement des différentes souches individualisées sur PCA)
- √ culture des souches isolées (PCA)
- √ mise en évidence d'un éventuel pouvoir inhibiteur sur les souches « test » utilisées lors de la détection des antibiotiques (dépôt de 10 µl de suspension de culture bactérienne pure sur une gélose ensemencée par les souches « test » et observation)
- √ identification des souches présentant une zone d'inhibition

Les identifications ont été réalisées par le service du Dr Janssens, BCCM<sup>TM</sup>/LMG (Culture collection laboratorium voor microbiologie - Universiteit Gent - K.L. Ledeganckstraat 35 - B-9000 Gent - Belgium).

**Tableau 14** : Identification des souches contaminantes

<b>Culture plate 1</b> Technique : Results :	ID 1 BIOLOG * <i>Pantoea agglomerans</i> - very good score
<b>Culture plate 2</b> Technique : Results :	ID 2 FAME ** <i>Bacillus cereus</i> group ( <i>B. cereus/thuringiensis/mycoides</i> ) - good score
<b>Culture plate 3</b> Technique : Results :	ID 3 FAME <i>Bacillus pumilus</i> - good score
<b>Culture plate 4</b> Technique : Results :	ID 4 FAME <i>Bacillus subtilis</i> ( <i>B. subtilis/amyloliquefaciens/...</i> ) - good score
<b>Culture plate 5</b> Technique : Results :	ID 5 FAME <i>Bacillus licheniformis</i> - very good score
<b>Culture plate 6</b> Technique : Results :	ID 6 FAME <i>Bacillus pumilus</i> - good score
<b>Culture plate 9</b> Technique : Results :	ID 7 BIOLOG <i>Escherichia hermanii</i> - good score
<b>Culture plate 12</b> Technique : Results :	ID 8 FAME <i>Bacillus subtilis</i> ( <i>B. subtilis/amyloliquefaciens/...</i> ) - acceptable score
* : BIOLOG : BIOLOG GN microtiter plates, designed to test the ability of an organism to oxidize 95 different carbon sources, are inoculated and the results interpreted according to the instructions of the manufacturer (Biolog Inc., California U.S.A.). This technique was chosen over the FAME analysis for those two cultures that were fermentative.	
** : FAME : the fatty acid composition of the cell membranes was determined gaschromatographically. The extraction and the analysis were performed conform to the recommendations of the commercial identification system MIDI (Microbial Identification System, Inc., Delaware U.S.A.).	

La procédure décrite succinctement ci-dessus a permis d'isoler 6 souches bactériennes (Tableau 14) produisant un effet inhibiteur (Figure 39) : *Pantoea agglomerans*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* et *Escherichia hermanii*. La même procédure appliquée à une série d'échantillons de viande de poulet présentant des résultats positifs anormaux a permis d'isoler une souche de *Klebsiella oxytoca* (identification non formelle mais très probable), active vis-à-vis des souches « test ».



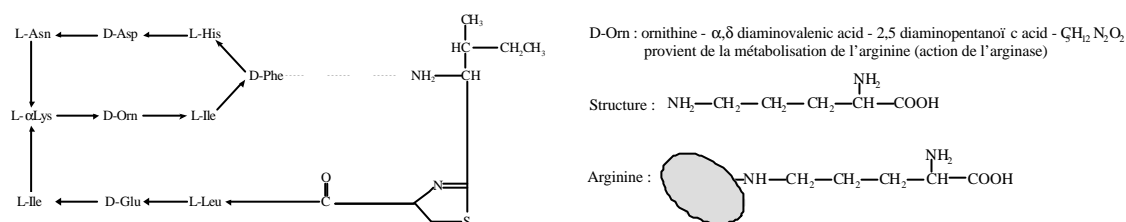
**Figure 39** : Mise en évidence du pouvoir inhibiteur de souches bactériennes

Plusieurs publications renseignent la production de polypeptides antibiotiques au sein du genre *Bacillus*. Le Tableau 15 reprend les trois souches isolées à partir de matières premières positives et quelques uns des peptides à action antibiotique qu'elles produisent.

**Tableau 15 :** Quelques antibiotiques polypeptidiques synthétisés par trois espèces bactériennes appartenant au genre *Bacillus*

<i>Bacillus pumilus</i>	micrococine P - pumilline – tetaïne
<i>Bacillus licheniformis</i>	bacitracine, licheniformine, proticine
<i>Bacillus subtilis</i>	subtiline, bacilysine, bacilline, bulbiformine, iturine, neocidine, fongistatine

Parmi la série d'antibiotiques renseignés dans le Tableau 15, la bacitracine présente un intérêt particulier. En effet, cet antibiotique dont la structure du composé majoritaire (bacitracine A) est reprise à la Figure 40 est utilisé comme additif alimentaire et comme promoteur de croissance. Il est donc important de vérifier la présence de ce groupe de composés dans les aliments.



**Figure 40 :** Structure de la bacitracine A

La première étape a consisté en la détermination de conditions d'obtention des toxines (bactériostatiques ou bactéricides) à partir des souches isolées et identifiées dans les aliments et en la définition du caractère thermosensible de ces toxines.

Les différentes souches isolées ont été cultivées en milieu liquide dans une première série d'incubations. Dans une seconde série, ces souches sont cultivées en présence des micro-organismes tests (toujours en milieu liquide). Après incubation, les différents milieux seront analysés avant et après stérilisation (à chaud et à froid) afin de contrôler la présence dans les milieux stériles d'un pouvoir inhibiteur.

1<sup>ère</sup> série d'incubations

Les souches tests et les souches analysées sont relancées dans 5 ml de milieu d'enrichissement (eau peptonée tamponnée). Les incubations sont conduites à 40°C en étuve agitée ventilée.

2<sup>ème</sup> série d'incubations

0,5 ml de chaque suspension obtenue lors de la première série est relancée dans 9,5 ml de milieu d'enrichissement (S1 à S8).

3<sup>ème</sup> série d'incubations

On mélange dans 9,5 ml de milieu d'enrichissement 0,5 ml de la suspension de la souche test et 0,5 ml de la suspension d'une souche à analyser. On obtient ainsi 32 suspensions mises à incuber en étuve à 40°C (sous agitation et ventilation) selon le schéma suivant :

	ID 1	ID 2	ID 3	ID 4	ID 5	ID 6	ID 7	ID 8
Subtilis	S 1.1	S 2.1	S 3.1	S 4.1	S 5.1	S 6.1	S 7.1	S 8.1
Luteus	S 1.2	S 2.2	S 3.2	S 4.2	S 5.2	S 6.2	S 7.2	S 8.2
Aureus	S 1.3	S 2.3	S 3.3	S 4.3	S 5.3	S 6.3	S 7.3	S 8.3
Calidolactis	S 1.4	S 2.4	S 3.4	S 4.4	S 5.4	S 6.4	S 7.4	S 8.4

Il reste donc au terme des trois séries d'incubations, les 8 souches à analyser (+/- 7 ml de chaque, numérotée de S1 à S8) et les 32 mélanges (10.5 ml de chaque, numérotés de S 1.1 à S 8.4).

Pour ces 40 milieux, environ 4 ml sont filtrés de manière stérile (filtres Acrodisc) dans des tubes stériles (Milieu stérilisé à froid, numéroté MF1 à MF40). Le reste du milieu (contenant les cultures) est stérilisé à l'autoclave (Milieu stérilisé à chaud, numéroté MC1 à MC40). Les tests d'inhibition sont réalisés sur ces 80 milieux.

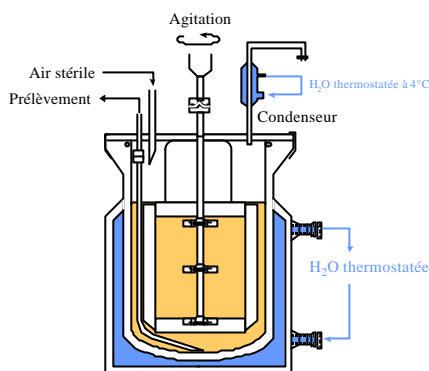
La comparaison des inhibitions obtenues pour les souches seules, pour les souches en mélange après stérilisation à froid et après stérilisation à chaud donneront l'information concernant la nature de la production des inhibiteurs (induction par la présence d'une autre souche ou métabolisme naturel de la souche) et concernant la nature thermosensible des toxines (si l'inhibition perdure après stérilisation à chaud, toxine thermostable).

Les résultats du *Bacillus licheniformis* sont particulièrement intéressants pour les raisons évoquées ci-dessus : la bacitracine est utilisée comme additif alimentaire et comme promoteur de croissance. Le pouvoir inhibiteur de cette souche est obtenu quelles que soient les conditions d'incubation : la présence des souches « test » n'est pas indispensable pour provoquer l'apparition de l'inhibition. Il n'y a donc pas induction.

Le *Bacillus licheniformis* isolé a été cultivé en fermenteur (Figure 41) dans deux types de milieu liquide dont les compositions sont reprises ci-dessous.

Milieu A (eau peptonée tamponnée) : 10 g de peptones de viandes [bacto peptones], 5 g de chlorure de sodium, 3.5 g de phosphate disodique et 1.5 g de dihydrogénophosphate de potassium, le tout porté à 1 litre avec de l'eau déminéralisée

Milieu B (milieu basé sur la composition du PCA mais sans agar) : 2 g d'extrait de levure, 5 g de dextrose et 6 g de peptones de caséine, le tout porté à 1 litre avec de l'eau déminéralisée



**Figure 41** : Schéma du fermenteur utilisé pour la culture de *Bacillus licheniformis*

Lors de chaque incubation, un second fermenteur contenant le milieu non ensemencé a été placé en série sur le circuit d'eau thermostatée à 44°C. Un échantillon de milieu est prélevé de manière stérile dans chaque fermenteur au temps  $t=0$  et ensuite, toutes les 12 heures durant 7 jours. Les échantillons sont stérilisés à chaud (121°C durant 20 minutes) et à froid (filtration sur filtre 0.22  $\mu$ ). Les extraits stérilisés sont alors testés afin de mettre en évidence l'apparition d'un pouvoir inhibiteur.

Les résultats obtenus sur ces extraits montrent l'apparition d'un pouvoir inhibiteur essentiellement dans la culture en milieu A (eau peptonée tamponnée). La stérilisation à chaud indique une légère perte d'inhibition par rapport à la filtration. Mais, sur les échantillons contenant suffisamment d'inhibiteur, il est plus facile de stériliser à chaud que de filtrer, la détermination n'étant pas quantitative mais bien qualitative. L'analyse du milieu contenant l'inhibiteur (fractionnement, isolement des fractions inhibitrices, analyse chromatographique couplée à différents détecteurs) devrait conduire à l'identification du facteur responsable de l'inhibition et au contrôle de son éventuelle présence dans des échantillons déclarés positifs.

### 3.3.2.5.2 Analyse chromatographique des milieux présentant une inhibition

Les milieux contenant un facteur inhibant ont été analysés par chromatographie liquide afin de vérifier la présence de bacitracine. Ces analyses ont été réalisées sur une chaîne HPLC de la marque Waters (Système Alliance 2690) couplée à un détecteur photodiode array (Waters 996), la gestion de la chaîne et des résultats étant effectuée au moyen du logiciel Millennium<sup>32</sup>. La colonne utilisée est une colonne Symmetry300™ C<sub>18</sub> 5  $\mu$ m, 2.1\*150mm de Waters. Les conditions d'éluion sont reprises au Tableau 16. Le volume injecté est de 20  $\mu$ l et le débit est de 0.5 ml/minute.

**Tableau 16** : Analyses chromatographiques - programme d'élution

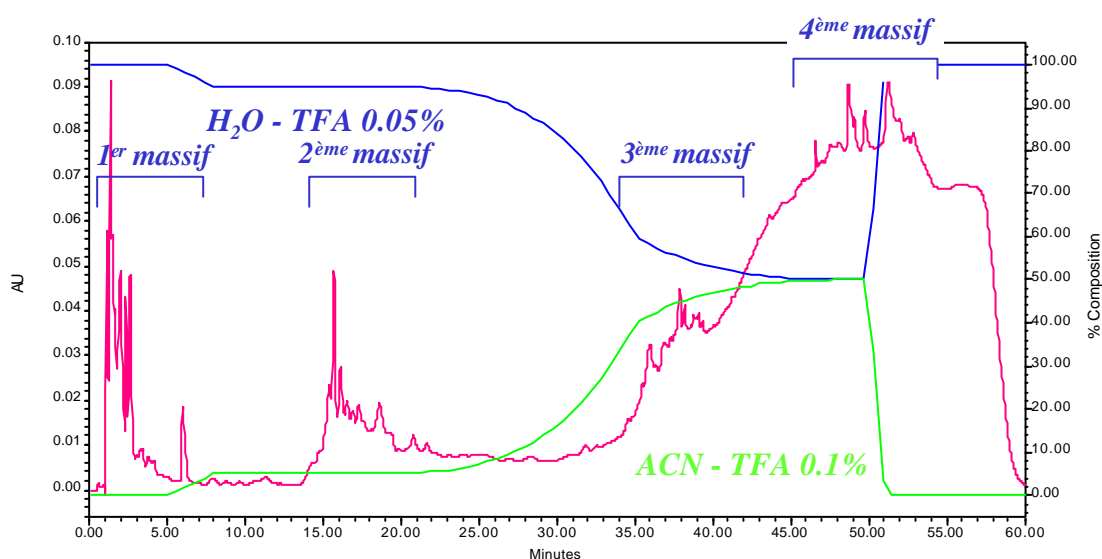
Temps (minutes)	Solvant A (%)	Solvant B (%)	Type d'élution
0	100	0	Isocratique
5	100	0	Isocratique
8	95	5	Gradient linéaire
18	95	5	Isocratique
35	60	40	Gradient curve (A)
50	50	50	Gradient curve (A)
51	97	3	Gradient linéaire
51.5	100	0	Gradient linéaire
60	100	0	Isocratique

Solvant A : H<sub>2</sub>O - TFA 0.05 %

Solvant B : ACN - TFA 0.1 %

La préparation des échantillons a consisté en la stérilisation des milieux par filtration, en la dilution au dixième dans le solvant A et ensuite en la filtration sur filtre 0.45 µm. Les échantillons ainsi préparés ont été stockés à 10°C.

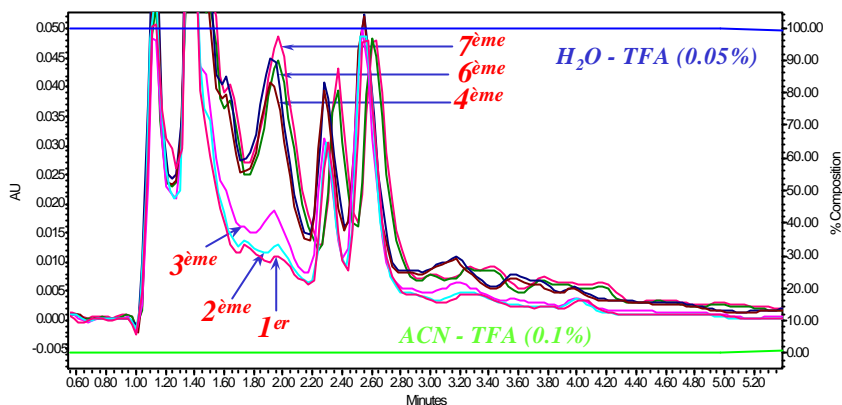
La séparation, bien que n'étant pas parfaite (Figure 42), nous apporte une série d'éléments intéressants à corréler avec les résultats des tests microbiologiques d'inhibition.



**Figure 42** : Chromatogramme obtenu en chromatographie liquide à haute performance du milieu de croissance de *Bacillus licheniformis*

En effet, si on observe les chromatogrammes correspondants à des prélèvements successifs de milieu, on remarque que deux zones du chromatogramme sont sujettes à modifications en fonction de l'apparition et de la disparition du pouvoir inhibiteur. Il s'agit des zones « 1-3 minutes » (fonction directement proportionnelle) et « 36-40 minutes » (fonction inversement proportionnelle).

**Cinétique de production du pouvoir inhibiteur - 1<sup>er</sup> massif**

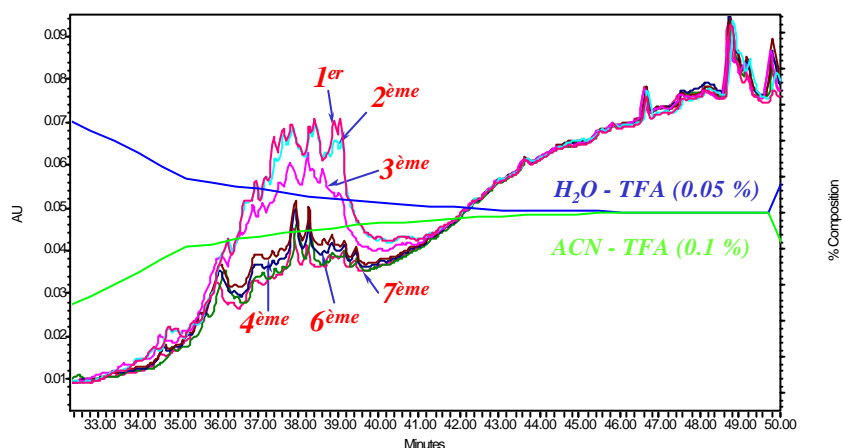


1<sup>er</sup> massif :  
zone « 1-3 minutes »

**Prélèvements :**

- 1<sup>er</sup> : t = 0
- 2<sup>ème</sup> : t = 12 h
- 3<sup>ème</sup> : t = 24 h
- 4<sup>ème</sup> : t = 84 h
- 5<sup>ème</sup> : t = 96 h
- 6<sup>ème</sup> : t = 108 h
- 7<sup>ème</sup> : t = 120 h

**Cinétique de production du pouvoir inhibiteur - 3<sup>ème</sup> massif**



3<sup>ème</sup> massif : zone  
« 36-40 minutes »

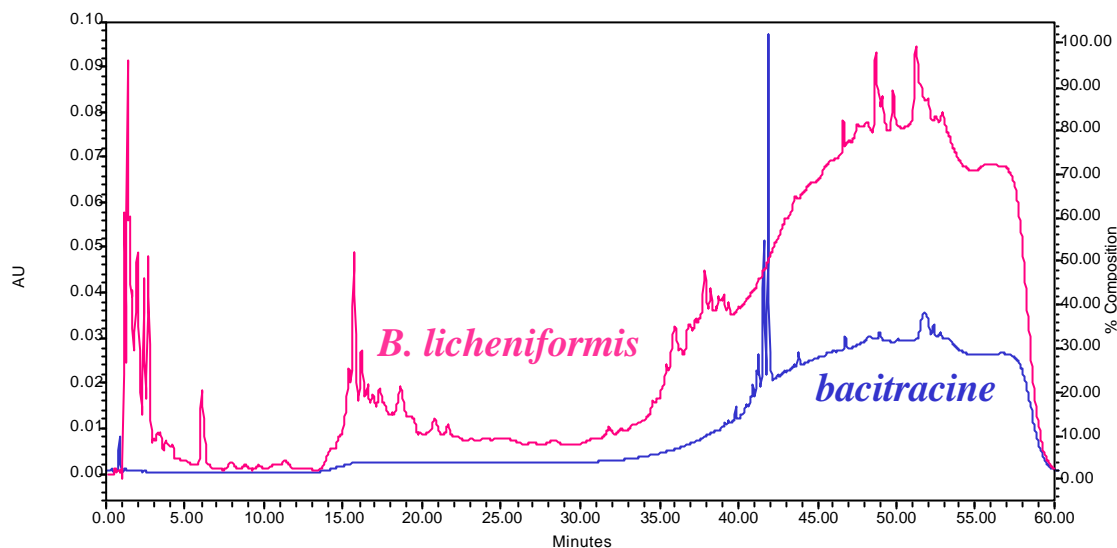
**Prélèvements :**

- 1<sup>er</sup> : t = 0
- 2<sup>ème</sup> : t = 12 h
- 3<sup>ème</sup> : t = 24 h
- 4<sup>ème</sup> : t = 84 h
- 5<sup>ème</sup> : t = 96 h
- 6<sup>ème</sup> : t = 108 h
- 7<sup>ème</sup> : t = 120 h

**Figure 43 :** Chromatogrammes successifs du milieu *Bacillus licheniformis*

Le *Bacillus licheniformis* étant utilisé pour produire la bacitracine, cette dernière a été injectée dans les mêmes conditions (HPLC) afin de vérifier son absence dans le milieu de culture obtenu après incubation. La Figure 44 reprend la superposition des chromatogrammes de la bacitracine et du milieu. Cette comparaison permet d'affirmer que la bacitracine n'était effectivement pas présente dans le milieu.





**Figure 44** : Comparaison entre les chromatogrammes de la bacitracine et du milieu d'incubation (*Bacillus licheniformis*)

### 3.3.3 Mise au point de techniques analytiques (HPLC) destinées à la confirmation (identification et dosage) des inhibiteurs présents

Une approche de la détection des sulfamides par fluorescence a été envisagée. Ce point a fait l'objet d'un travail de fin d'études présenté à la Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux (« *Mise au point d'une méthode HPLC par détection fluorimétrique en vue de l'analyse de sulfamides dans des aliments pour animaux* », M. Dannau, 1999). Cette méthode permet d'éliminer un grand nombre d'interférences lors de la détection. L'utilisation des sulfamides en tant qu'« additifs alimentaires » est relativement importante dans les élevages industriels. Une utilisation massive de ces antibactériens permet d'augmenter le rendement de l'élevage (gain de poids corporel) tout en réduisant la mortalité au sein de cet élevage (aspect préventif). Dans l'élevage des volailles, les sulfamides sont surtout utilisés en tant que coccidiostatiques. Leur usage vise aussi à réduire la typhose et le choléra aviaires.

Actuellement, un prémélange médicamenteux (Tableau 17) contenant de la sulfadiazine est autorisé comme additif alimentaire, les autres sulfamides étant interdits comme additifs. Il faut donc développer les méthodes analytiques permettant de déceler la présence de ces antibactériens à des teneurs les plus proches possibles de zéro.

**Tableau 17** : Liste exhaustive des prémélanges médicamenteux enregistrés

Dénomination du prémélange et concentration de substance active en g/kg de prémélange (Nom de la firme)	Indication	Teneur de substance active en mg/kg d'aliment	Délai d'attente Durée du traitement
<b>Tucoprim</b> Sulfadiazine : 125 Triméthoprim : 25 (Pharmacia & Upjohn)	Prévention et traitement des infections dues à des bactéries sensibles à l'association de la sulfadiazine avec le triméthoprim : Porc : ■ syndrome mastite-métrite-agalaxia (MMA) ■ Infections streptococciques et des entérites dues à E. coli Volailles non pondeuses	Sulfadiazine + triméthoprim ■ porcelets : 210 à 480 ■ porcs à l'engraissement : ■ truies : 1500 ■ volailles non pondeuses : 300	5 j                    5 j 5 j                    5 j 5 j                    de 3 j avant la mise bas à 2 j après 24 h                    10 j

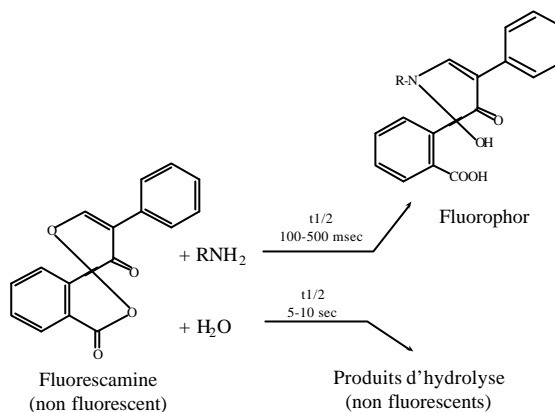
A côté de ce prémélange, d'autres médicaments, renseignés comme tels sont utilisés.

Il apparaît que l'usage des sulfamides reste très important dans les élevages de porcs et de volailles. D'après Patel, environ 34 % de la nourriture animale contenant des additifs médicamenteux serait gérée hors prescription vétérinaire.

### 3.3.3.1 Méthodes de détection des sulfamides

Les tests d'acidification sont basés sur le pouvoir inhibiteur des antibiotiques et des sulfamides vis à vis de souches bactériennes. La mise en évidence du pouvoir inhibiteur se traduit par l'absence d'acidification du milieu de croissance, révélée par le non virage d'un indicateur de pH (pourpre de bromocrésol). Ces tests ne permettent cependant pas d'identifier et de doser l'inhibiteur présent. Ce dernier peut par ailleurs être tout à fait indépendant d'antibiotiques (système enzymatique du lait, par exemple).

Les tests immunochimiques sont basés sur la réaction antigène-anticorps. Ils permettent de mettre en évidence, de manière très spécifique, des substances à des teneurs très faibles. La révélation de la réaction de complexation entre l'antigène et l'anticorps se fait par radioactivité (RIA) ou par réaction enzymatique (EIA). Ces tests, très sensibles présentent l'inconvénient d'être rapidement saturés, d'être très spécifiques (d'où multiplicité de tests en fonction des molécules à rechercher) et d'être chers. La spécificité multiplie en outre le coût total d'une analyse.



**Figure 45 :** Réaction de fluorescence d'une amine primaire en présence de fluorescamine (Udenfriends, 1972)

Les méthodes chromatographiques (sur couche mince, gazeuse ou liquide) présentent de nombreux avantages : elles permettent notamment de séparer, d'identifier et de doser les résidus présents dans l'extrait. L'utilisation de détecteurs spécifiques, en l'occurrence la fluorescence, élimine les interférences dues aux méthodes d'extraction. Les sulfamides sont rendus fluorescents par réaction avec la fluorescamine selon le principe développés à la Figure 45.

La réaction, spécifique des amines primaires, va entraîner la formation d'un dérivé pyrrolinone qui, après excitation à 405 nm, va émettre une forte fluorescence à 495 nm (Simeonidou *et al.*, 1996). L'intensité de l'émission de fluorescence est plus élevée à un pH proche de 3. Elle diminue lorsque ce pH varie (augmentation ou diminution) (Van Wijnsberghe, 1994).

Les méthodes chromatographiques, et plus particulièrement, la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) feront l'objet de développements dans les paragraphes suivants.

### 3.3.3.2 Préparation de l'aliment

L'aliment utilisé est constitué d'un mélange réalisé au laboratoire et comprenant différentes matières premières : orge (150 g), pulpes déshydratées (300 g), mélanges protéiques (noix 40 : 300g - *schijns* : 200 g), soja, germe de maïs (*schijns* 16 : 300 g). Ces différents constituants sont broyés et homogénéisés. L'analyse ultérieure sera réalisée sur la mouture (10 g) sous forme brute ou dopée. Le dopage de la mouture doit conduire à une concentration dans l'aliment de 1 ppm, soit 1 mg/kg. Pour la masse de 10 g d'aliment, il faut donc ajouter 10 µg de substance active. La substance active est ajoutée sur forme de solution (50 µl d'une solution à 200 ppm).

Les 10 g du mélange d'aliments seront extraits et analysés tant par analyse microbiologique (cfr point 3.3.2.3) que par analyse HPLC.

### 3.3.3.3 Analyse et résultats

La première étape de développement correspond à l'étude de la stabilité des complexes fluorescents : cinétique de la réaction et stabilité une fois le maximum de fluorescence atteint. Cette première étape a été effectuée sur des solutions standards individuelles au fluorimètre et sur des solutions standards en mélange par HPLC. Cette première étape permet aussi de définir les paramètres HPLC tels que colonne, choix de l'éluant, volume d'injection.

La seconde étape du développement consiste à analyser des aliments non dopés afin d'identifier d'éventuelles interférences lors de l'analyse HPLC (pics parasites, ligne de base non stable) sur base des paramètres définis lors de la première étape.

La troisième étape vise à analyser des aliments dopés en divers sulfamides. Cette étape permet d'affiner les paramètres d'extraction en quantifiant les taux de récupération des sulfamides.

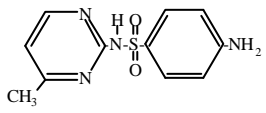
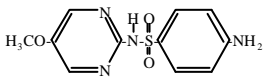
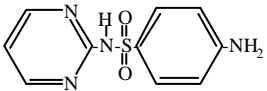
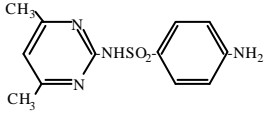
La comparaison de la méthode développée avec la méthode officielle utilisée en Belgique sur des aliments « de terrain » constitue la dernière étape de la mise en place de ce système de contrôle : les pics obtenus seront comparés tant d'un point de vue qualitatif que quantitatif.

#### 3.3.3.3.1. Étude des complexes fluorescents

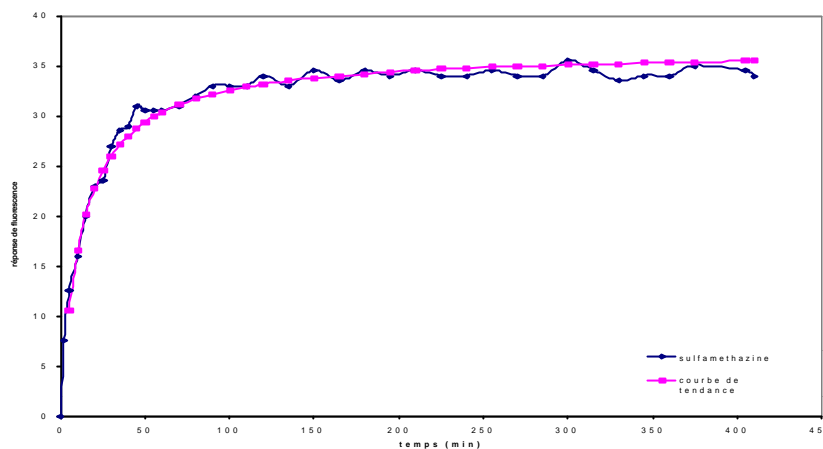
La cinétique de fluorescence et la stabilité du « complexe » ainsi formé a été étudiée dans un premier temps au fluorimètre sur des solutions de sulfamides de 10 ppm (10 mg/kg) dans un mélange 60/40 acide acétique 2 % / acétonitrile. Les échantillons étaient préparés selon le protocole suivant : 1 ml d'échantillon (10 ppm) est ajouté à 1 ml HCl 2 N. A ce premier mélange sont ajoutés successivement 1.56 ml d'une solution 1.25 M d'acétate de sodium, 2 ml de tampon à pH = 3 et 1.2 ml de fluorescamine. La concentration en fluorescamine a été modifiée afin de vérifier l'influence de sa teneur sur la vitesse de réaction. La longueur d'onde d'excitation est égale à  $\lambda_{ex} = 405$  nm et la longueur d'onde d'émission est égale à  $\lambda_{em} = 495$  nm.

L'échantillon ainsi préparé est placé dans une cellule d'analyse et des lectures sont effectuées à intervalle de temps constant. Ces mesures ont permis d'établir des cinétiques pendant une période de 7 à 8 heures pour les sulfamides dont la liste est reprise au Tableau 18.

**Tableau 18** : Liste des sulfamides étudiés (nom, abréviation et formule)

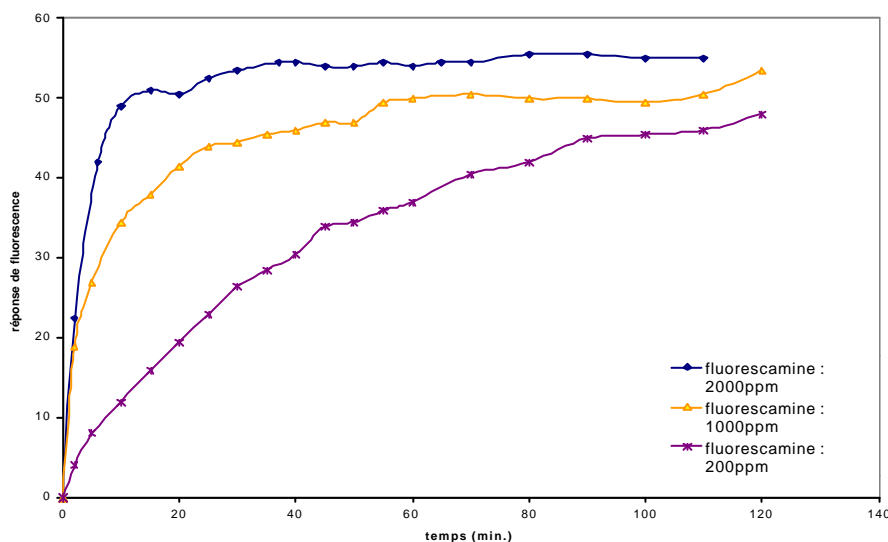
Sulfamérazine <b>SMR</b>		Sulfameter <b>SME</b>	
Sulfadiazine <b>SDZ</b>		Sulfaméthazine <b>SMT</b>	
Sulfadiméthoxine <b>SDMX</b>		Sulfaméthoxazole <b>SMZ</b>	
Sulfaméthizole <b>SMTZ</b>			

La Figure 46 montre que la maximum de fluorescence n'est pas atteint immédiatement après l'ajout de fluorescamine mais après un certain temps que l'on peut estimer dans ce cas à une centaine de minutes (1 heure 40). Tous les sulfamides étudiés montrent le même profil.



**Figure 46 :** Evolution au cours du temps de la réponse de fluorescence d'une solution de sulfaméthazine (10 ppm) dérivée par de la fluorescamine (200 ppm)

L'utilisation de solutions de fluorescamine de plus en plus concentrées (pour une même concentration en sulfamides) permet de réduire considérablement la durée de réaction pour atteindre la valeur de fluorescence maximale (Figure 47). Ainsi, l'utilisation d'une solution à 2.000 ppm à la place de la solution à 200 ppm en fluorescamine permet d'atteindre le palier en 25 minutes (pour le sulfadiméthoxine 10 ppm). Pour la sulfaméthazine, cette période se résume à quelques minutes.



**Figure 47 :** Évolution au cours du temps de la réponse de fluorescence d'une solution de sulfadiméthoxine (10 ppm) dérivée à la fluorescamine (200, 1.000 et 2.000 ppm)

Les résultats obtenus montrent que la réponse de fluorescence est proportionnelle à la quantité de sulfamides présents (Tableau 19). La vitesse pour atteindre le

maximum de fluorescence est quant à elle fonction de la concentration en fluorescamine. Un compromis est nécessaire entre la vitesse de réaction et la quantité de fluorescamine à ajouter : ce dernier composé est effectivement très cher à l'achat et ne peut donc pas être inutilement gaspillé. Ce compromis doit tenir compte aussi de la durée d'analyse par HPLC.

**Tableau 19** : Évaluation de linéarité de la réponse de fluorescence au cours du temps (fluorimètre)

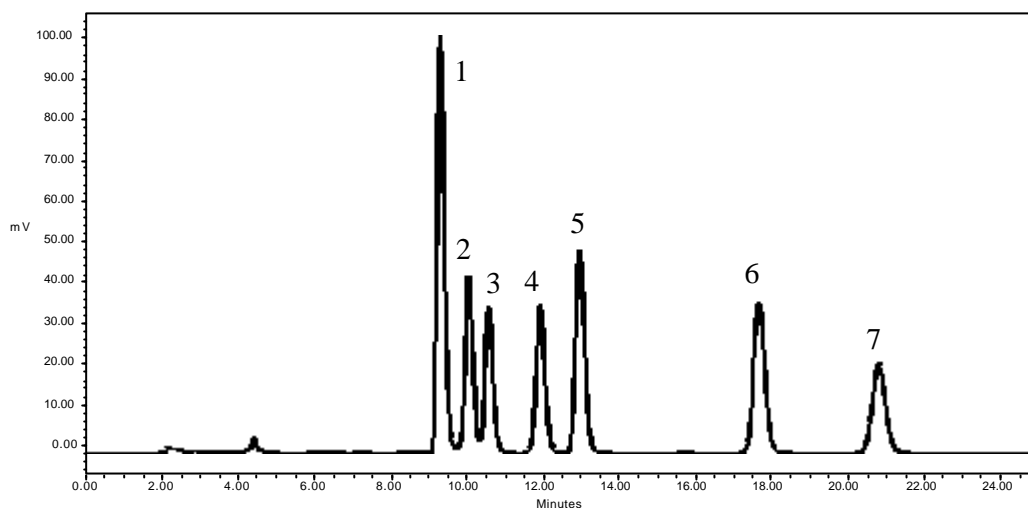
Sulfaméthazine	2,5 ppm	5 ppm	10 ppm	Sulfaméthizole	2,5 ppm	5 ppm	10 ppm
30 minutes	9	19	37,5	30 minutes	12	23,5	48
60 minutes	9	20	40	60 minutes	12,5	25	49
90 minutes	9	20	39,5	90 minutes	12,5	25	48

Afin d'affiner les paramètres de la réaction entre fluorescamine et sulfamides, le suivi de la fluorescence d'un mélange des 7 sulfamides (100 µg/l ou 100 ppb) cités ci-dessus (Tableau 19) a été effectué pendant une période de 24 heures. L'impact de la température de conservation des échantillons après dérivatisation à la fluorescamine a été évalué à deux température : 4°C et 20°C. Cette comparaison permet de définir la température de stockage des échantillons après réaction.

La Figure 48 montre la séparation chromatographique obtenue dans les conditions suivantes :

	Cinétique à 20°C	Cinétique à 4°C
<b>Fluorescamine</b>	10 mg/50 ml	25 mg/50 ml
<b>Volume d'injection</b>	50 µl	50 µl
<b>Temps d'analyse</b>	30 minutes	30 minutes
<b>T°C colonne</b>	40°C	40°C
<b>T°C échantillon</b>	20°C	4°C
<b>Débit</b>	1 ml/minute	1 ml/minute
<b>Phase mobile</b>	Acide acétique 2 % / ACCN (60/40)	Acide acétique 2 % / ACCN (60/40)

La préparation de l'échantillon (réaction de dérivatisation) est décrite ci-dessus (1<sup>er</sup> paragraphe du point 3.3.3.3.1.).



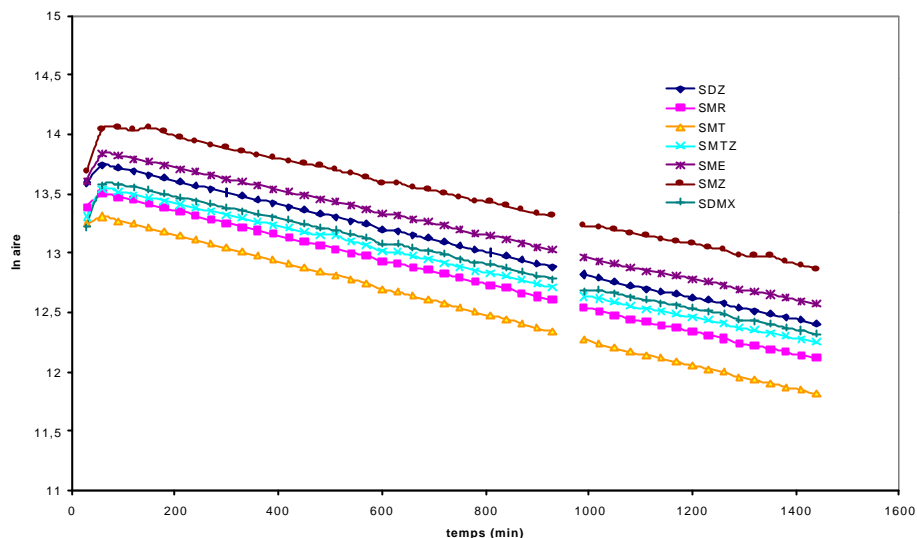
**Figure 48 :** Séparation des 7 sulfamides étudiés par chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC) après dérivation à la fluorescamine

Le Tableau 20 reprend l'ordre d'éluion et les temps de rétention des différents sulfamides.

**Tableau 20 :** Ordre d'éluion et temps de rétention des sulfamides dérivés à la fluorescamine

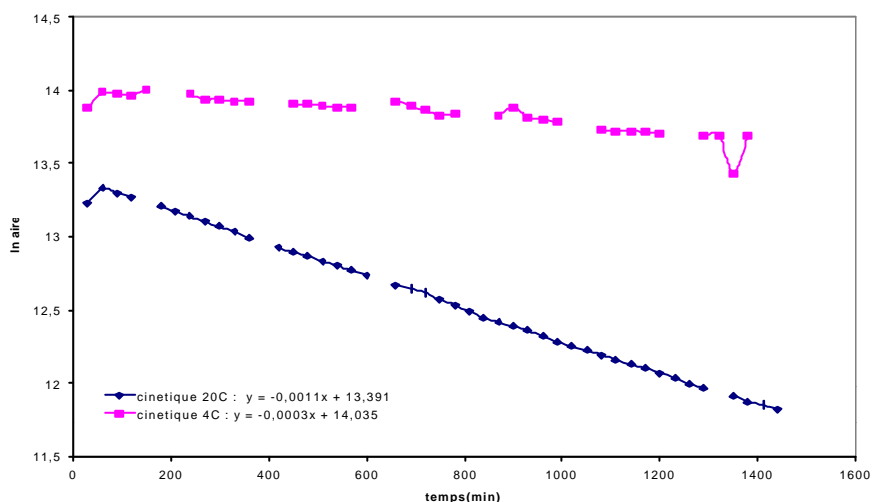
Pic n°	Nom	Abréviation	Temps de rétention (minute)
1	Sulfadiazine	SDZ	9.5
2	Sulfamérazine	SMR	10.2
3	Sulfaméthazine	SMT	10.8
4	Sulfaméthizole	SMTZ	12.1
5	Sulfameter	SME	13.2
6	Sulfaméthoxazole	SMZ	18.0
7	Sulfadiméthoxine	SDMX	21.2

La Figure 49 illustre l'évolution de la fluorescence des 7 « complexes » fluorescents obtenus à partir des 7 sulfamides. L'évolution (perte de fluorescence) est similaire pour les 7 composés : il s'agit d'une courbe d'ordre 1.



**Figure 49 :** Évolution de la fluorescence des « complexes » sulfamides-fluorescamine à 20°C (concentration en sulfamide : 100 µg/l par sulfamide) sur une période de 24 heures

Une évolution semblable est observée pour les dérivés conservés à 4°C (Figure 50), la pente de la courbe étant cependant beaucoup plus faible. Les points manquants dans la courbe à 4°C correspondent à l'injection de blancs.



**Figure 50 :** Comparaison de l'évolution de la fluorescence du « complexes » sulfamérazine-fluorescamine à 20°C et à 4°C (concentration en sulfamide : 100 µg/l) sur une période de 24 heures

Les équations des droites, calculées en négligeant la première valeur, permettent de calculer des demi-vies pour les réactions aux deux températures. La valeur de cette demi-vie est calculée sur base de la formule suivante :

$$T_{1/2} = 0.693 / k$$



où  $k$  est la pente de la droite de régression. Pour la cinétique à 20°C, les  $T_{1/2}$  des 7 sulfamides sont repris dans le Tableau 21 :

**Tableau 21** :  $T_{1/2}$  des complexes sulfamides-fluorescamine lors d'un stockage à 20°C

Noms	Moyenne des $T_{1/2}$ calculée sur 5 répétitions
Sulfadiazine	683 minutes
Sulfamérazine	669 minutes
Sulfaméthazine	609 minutes
Sulfaméthizole	723 minutes
Sulfameter	739 minutes
Sulfaméthoxazole	358 minutes
Sulfadiméthoxine	739 minutes

Pour les dérivés stockés à 4°C, il est impossible de calculer un  $T_{1/2}$ , la valeur de la pente de droite de régression étant beaucoup trop faible. Les valeurs obtenues lors de l'application de la formule de calcul sont telles que l'on ne peut s'y fier. Pour comparer les évolutions de fluorescence aux deux températures, un ratio  $F_{12h}$  est alors défini. Ce ratio correspond au rapport

$$F_{12h} = S_{720} / S_{60}$$

où  $S_{720}$  est l'aire du pic obtenue pour le dérivé fluorescent au bout de 12 heures (720 minutes) et  $S_{60}$  est l'aire maximale obtenue pour le dérivé fluorescent après 60 minutes. Ce ratio représente en fait le taux de dégradation de la solution après 12 heures. Le Tableau 22 donne les  $F_{12h}$  des différents sulfamides à 4°C et à 20°C.

**Tableau 22** :  $F_{12h}$  des différents sulfamides à 4°C et à 20°C

	SDZ	SMR	SMT	SMTZ	SME	SMZ	SDMX
$F_{12h}$ à 20°C	0.52	0.50	0.48	0.53	0.54	0.56	0.55
$F_{12h}$ à 4°C	0.94	0.88	0.87	0.91	0.91	0.91	0.99

Ce Tableau montre que, après 12 heures de stockage à 4°C, l'intensité de fluorescence est toujours d'environ 90 %, alors qu'elle a chuté aux environs de 50 % de l'intensité initiale. La température de stockage des échantillons après dérivatisation sera donc de 4°C.

### 3.3.3.3.2. Analyse d'aliments non dopés

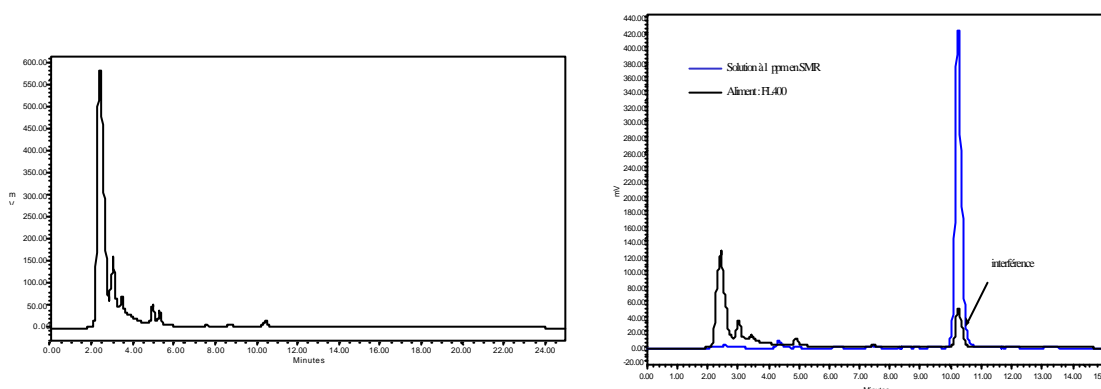
Les paramètres d'extraction correspondent aux paramètres définis pour l'analyse microbiologique, l'étape HPLC étant la confirmation d'un résultat positif en microbiologie. L'utilisation de l'éthanol lors de cette étape d'extraction résulte de la toxicité de l'acétonitrile, fréquemment renseigné dans la littérature comme solvant d'extraction, et de la volonté d'utiliser les extraits microbiologiques lors de la confirmation chromatographique.

L'analyse d'aliments non dopés va permettre de vérifier la présence éventuelle d'impuretés ou d'interférences dans les chromatogrammes. Les aliments analysés correspondent à la série suivante :

- un mélange préparé au laboratoire (composition reprisé au point ) (A 1)
- un aliment pour porc (A 2)
- un aliment annoté FL 400, constitué de 92 % de céréales et autres végétaux, 2.5 % de minéraux, 0.2 % de vitamines et 5 % de mélasse (A 3)
- six aliments dont la constitution (en %) est reprise ci-dessous (la matrice de base de l'aliment était inconnue)

	A 4	A 5	A 6	A 7	A 8	A 9
Graisses	1.1	7	1.7	7.1	0.6	3.4
Farines animales	0	5.8	5.2	6	0	5.5
Farines poissons	0	0	0	0	0	4

Après extraction à l'éthanol, il apparaît que des composés réagissent à la fluorescamine (amine primaire). Deux massifs d'impuretés peuvent perturber la détection en fluorescence. Le premier massif (Figure 51 - A) ne gêne pas l'analyse car il se trouve bien avant le premier sulfamide analysé.



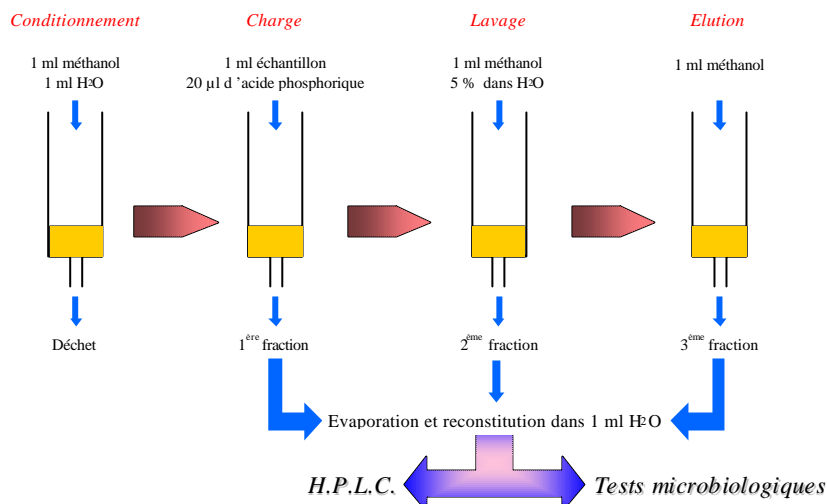
A : Aliment préparé au laboratoire (A 1)

B : Aliment FL 400 (A 3)

**Figure 51** : Interférences possibles lors de la détection des sulfamides par fluorescence

Par contre, la seconde interférence (Figure 51 - B) est plus embarrassante car elle sort au même temps de rétention que la sulfadiazine. Il est impossible à ce stade, de conclure à la présence d'une interférence ou à la présence de sulfadiazine dans l'échantillon A 3. Deux types d'extraction ont été envisagées afin de réduire ces interférences. Les extraits obtenus lors de l'extraction alcoolique ont ensuite été purifiés sur colonne Oasis™ (Waters).

Le schéma de purification sur colonne Oasis™ présenté à la Figure 52 n'a pas permis d'obtenir une élimination des interférences présentes.

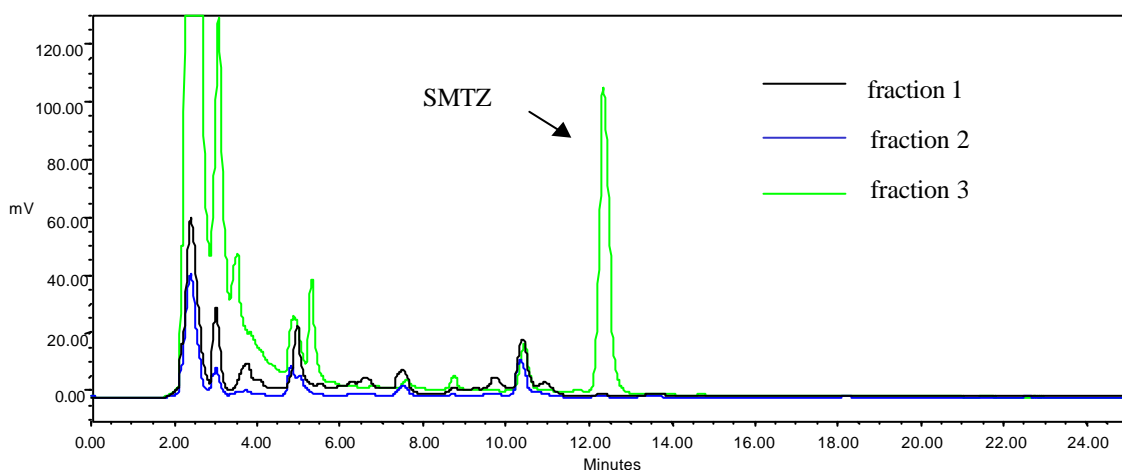


**Figure 52** : Protocole de purification sur colonne Oasis™ (Waters)

### 3.3.3.3. Analyse d'aliments dopés

Les différentes manipulations sur aliments dopés sont basées sur l'aliment **A 1** (mélange préparé au laboratoire et donc aucune interférence ne perturbe la détection). Le dopage de l'aliment s'est fait en ajoutant 50 µl d'une solution de sulfamides (200 ppm) à 10 grammes du mélange. Les extraits ont été injectés avant purification sur colonne Oasis™ et après purification afin de vérifier l'apport de la purification et d'évaluer les éventuelles pertes dues à cette manipulation.

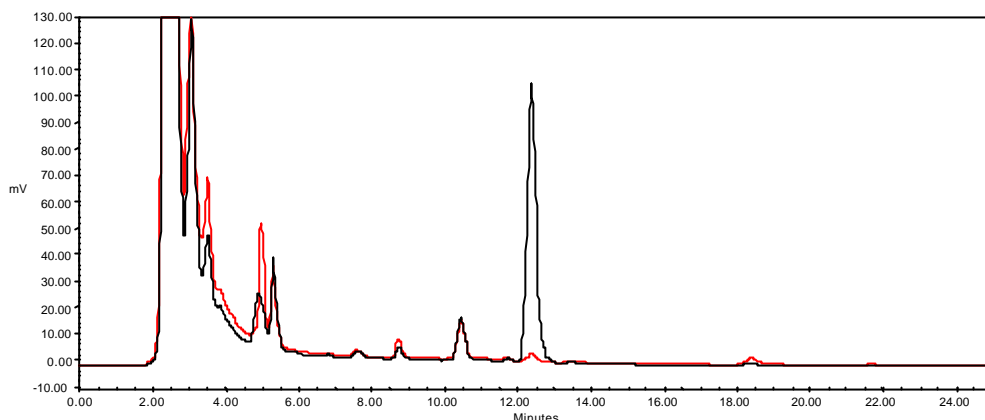
Le chromatogramme présenté à la Figure 53 permet de juger de la récupération dans la troisième fraction de la purification, de l'ensemble du sulfaméthizole utilisé pour doper l'aliment.



**Figure 53** : Chromatogramme correspondant au trois fractions obtenues après passage sur colonne Oasis™ de l'extrait alcoolique d'un aliment (**A 1**) dopé à 1 ppm de SMTZ

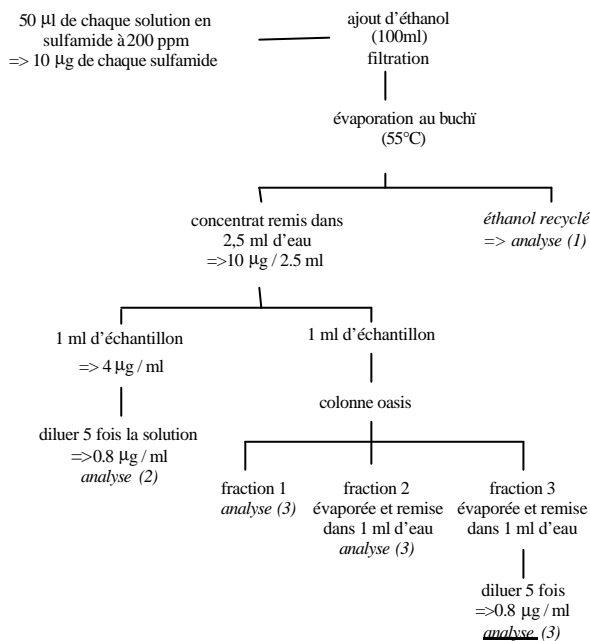
Les deux premières fractions ne contiennent effectivement pas de SMTZ.

La Figure 54 présente la comparaison entre le chromatogramme obtenu pour l'aliment non dopé et le chromatogramme obtenu pour le même aliment dopé (1 ppm de SMTZ). Il est manifestement difficile de ne pas déceler une telle teneur dans l'aliment dopé.



**Figure 54 :** Comparaison entre les chromatogrammes (fraction 3) obtenus pour l'aliment dopé et le même aliment non dopé

A partir de ces extractions, les différents calculs des rendements des taux d'extraction ont été effectués. Des mesures ont été réalisées à différents endroits du protocole analytique (Figure 55).



**Figure 55 :** Protocole analytique reprenant les différentes analyses effectuées

Le contrôle de l'éthanol recyclé (analyse 1) a montré que ce solvant ne contenait aucune trace de sulfamides. Les taux de récupération, calculés sur une solution de sulfamides, ont été évalués avant passage sur colonne Oasis™ et après purification sur colonne Oasis™ (Tableau 23).

**Tableau 23** : Taux de récupération (avant et après passage sur colonne Oasis) de solutions contenant les 7 sulfamides (moyenne  $\pm$  SD de 5 déterminations)

	Avant passage	Après passage
Sulfadiazine	105 % $\pm$ 5.6	92 % $\pm$ 10.5
Sulfamérazine	100 % $\pm$ 4.1	85 % $\pm$ 3.0
Sulfaméthazine	103 % $\pm$ 3.9	87 % $\pm$ 3.7
Sulfaméthizole	99 % $\pm$ 14.8	75 % $\pm$ 9.1
Sulfameter	107 % $\pm$ 5.3	88 % $\pm$ 4.9
Sulfaméthoxazole	103 % $\pm$ 4.6	86 % $\pm$ 5.4
Sulfadiméthoxine	96 % $\pm$ 3.4	78 % $\pm$ 6.3

Les mêmes taux de récupération ont été calculés sur un aliment dopé. Le Tableau 24 donne les résultats obtenus dans ce contexte. On observe que les taux de récupération avant passage sur colonne sont de l'ordre de 50 % (sauf pour le sulfadiméthoxine : 17 %) et que le passage sur colonne Oasis™ entraîne une perte substantielle de sulfamides. Cette étape, comme elle n'apporte rien lors de la suppression des interférences, provoque d'importantes pertes, elle peut donc être supprimée.

**Tableau 24** : Taux de récupération (avant et après passage sur colonne Oasis) obtenus après extraction des 7 sulfamides d'un aliment dopé (moyenne  $\pm$  SD de 3 déterminations)

	Avant passage	Après passage
Sulfadiazine	66 % $\pm$ 7.9	40 % $\pm$ 12.9
Sulfamérazine	59 % $\pm$ 8.8	20 % $\pm$ 5.1
Sulfaméthazine	52 % $\pm$ 4.7	15 % $\pm$ 0.3
Sulfaméthizole	37 % $\pm$ 7.7	9 % $\pm$ 20.0
Sulfameter	57 % $\pm$ 7.3	21 % $\pm$ 2.2
Sulfaméthoxazole	46 % $\pm$ 5.5	19 % $\pm$ 3.6
Sulfadiméthoxine	17 % $\pm$ 2.8	8 % $\pm$ 18.1

Les très fortes pertes ont pu être expliquées lors de l'évaporation des échantillons, avant la dérivatisation.

#### 3.3.3.3.4. Comparaison de la méthode officielle et de la méthode développée (fluorescence)

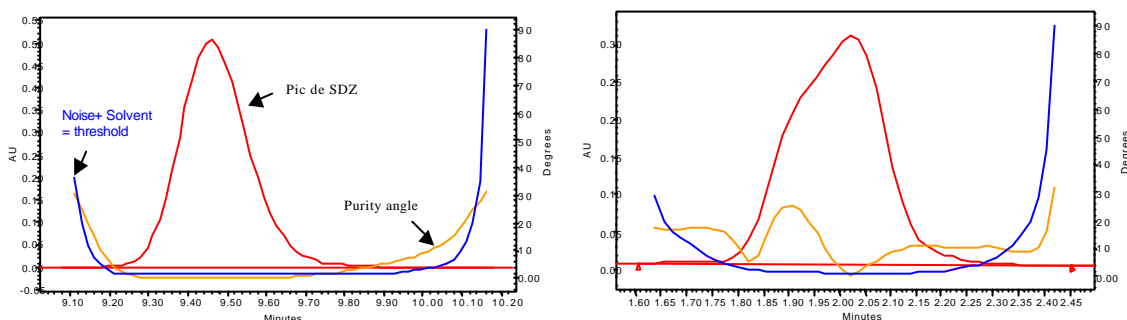
La recherche des sulfamides dans les aliments (additifs non autorisés sous une autre forme que prémélanges médicamenteux réglementés par la législation) se fait par méthode de screening HPLC avec détection U.V. au moyen d'un détecteur D.A.D. Cette façon de procéder permet d'analyser les chromatogrammes selon différentes longueurs choisies, propres à certains sulfamides.

Une série de 10 échantillons ont été reçus du laboratoire d'analyse de l'Etat de Tervuren. Ils ont été analysés selon le protocole développé et selon la méthode

officielle utilisée dans ce laboratoire pour détecter la présence ou l'absence de sulfamides. Cette méthode de screening doit être complétée par une analyse quantitative lorsque la présence de sulfadiazine est décelée et qu'elle peut être mise en rapport avec la présence de prémélange médicamenteux. Dans ce cas, la teneur doit être vérifiée.

Les 10 aliments reçus du laboratoire de l'Etat contenaient de la sulfadiazine à des teneurs allant de 300 à 1.500 ppm. Notre méthode permet de déceler sans problèmes ces concentrations. L'analyse par la méthode officielle a montré qu'effectivement, tous les échantillons contenaient bien ce sulfamide.

Les extraits obtenus par les deux méthodes d'extraction ont été dérivatisés et injectés en chromatographie phase liquide (avec détection D.A.D.) afin de vérifier la pureté des pics obtenus. Sans entrer dans les détails techniques de cet artifice de calcul, on peut dire que lorsque le « purity angle » est plus petit que le « purity threshold », il n'y a pas de coélution. Par contre, si le « purity angle » est plus grand que le « purity threshold », il y a coélution et donc présence de substances parasites. Ce test de pureté peut se traduire de manière graphique (Figure 56).



**Figure 56** : Test de pureté du pic de SDZ d'un des aliments reçu du laboratoire d'analyse de l'Etat par la méthode développée (à gauche) et par la méthode officielle (à droite)

La comparaison obtenue pour les deux méthodes montre nettement que le pic obtenu par la méthode officielle n'est pas pur, le « purity angle » étant supérieur au « purity threshold ». Ce pic ne peut donc pas être assimilé à SDZ. Si on reprend, pour les 10 aliments, la valeur du « purity angle », on constate que, systématiquement, elle est supérieure à la valeur du « purity threshold ». Dans aucun des cas, ces pics sont purs. La méthode développée présente par contre, des « purity angle » inférieurs aux « purity threshold » pour ce même pic de sulfadiazine. Cela signifie donc que les pics sont purs et qu'il n'y a pas de coélution. Le dosage du sulfamide présent peut donc être effectué directement.

*Conclusions  
et  
recommandations*

#### 4. Conclusions et recommandations

Le secteur de la viande traverse depuis plusieurs années une crise de confiance considérable et est l'objet de problèmes de sécurité alimentaire à répétition (hormones, antibiotiques, ESB, dioxines). Ce contexte a certainement favorisé le développement de nombreux signes distinctifs visant notamment à rassurer les consommateurs. Par ailleurs, ces productions de qualité particulière sont conçues dans le respect de l'environnement et du bien-être animal.

Les recherches menées dans le cadre de ce projet se concentrent sur le « poulet de chair ». Parmi les facteurs de production susceptibles de modifier la qualité de la viande de volailles, le principal facteur conduisant à une qualité organoleptique différente de la viande de poulet est un âge d'abattage proche de la maturité sexuelle. Face à ce paramètre incontournable, il a été nécessaire de sélectionner des individus dont la vitesse de croissance était moins élevée (souches à croissance lente). Une alimentation adaptée a également été mise au point afin d'obtenir des individus répondant aux critères commerciaux.

Ces facteurs associés à la présence d'un libre parcours, dont l'influence sur la qualité de la viande apparaît comme très limitée, confèrent à ces productions une image positive de production plus traditionnelle, respectueuse du bien-être des animaux et de l'environnement, qui rassure le consommateur et en fait le succès.

Ces choix conduisent à des coûts de production nettement plus élevés et justifient un différentiel de prix parfois important. Néanmoins, il est essentiel pour la crédibilité de ces productions de pouvoir les distinguer de manière objective. La mise au point de techniques analytiques d'authentification pouvant s'intégrer dans les systèmes de contrôle de ces productions apparaît comme une nécessité.

Les résultats obtenus lors de cette étude laissent entrevoir des possibilités de valorisation intéressantes :

L'authentification de l'origine génétique des produits de viande est une problématique encore non maîtrisée actuellement. Si de nombreux produits carnés proposés aux consommateurs garantissent une composition particulière, les techniques de biologie moléculaire préconisées à ce jour pour vérifier celle-ci (par exemple : la PCR-RFLP) ne permettent pas de détecter avec certitude toutes les espèces présentes dans un mélange.

Des stratégies reposant sur une PCR (Polymerase Chain Reaction) unique et sur l'amplification d'une cible universelle (région de l'ADN conservée chez différentes espèces) restent intéressantes mais le recours à de nouvelles techniques (les biochips) utilisant comme moyen de détection des sondes de capture très spécifiques internes aux fragments amplifiés devrait permettre d'obtenir des résultats fiables. Ce système de détection permettrait l'identification simultanée de plusieurs espèces animales présentes dans des aliments et serait suffisamment flexible pour être adapté à différentes problématiques (aux espèces à identifier selon la fraude suspectée) et aux modifications de la législation.

Pour ce qui concerne plus particulièrement la viande de poulet, la technique de l'AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) nous a permis de rechercher efficacement des déterminants moléculaires susceptibles de caractériser des souches de poulet à croissance lente (ou rapide). Cette technique d'investigation du polymorphisme de l'ADN présente les avantages d'être reproductible si l'on travaille sur un échantillon non dégradé et surtout, de ne nécessiter aucune connaissance préalable de la génétique et des schémas de sélection des éleveurs (données tenues confidentielles par les firmes de reproduction). Les résultats



obtenus jusqu'à présent (mise en évidence et caractérisation par séquençage de deux bandes discriminantes dont l'une n'est présente que chez les poulets à croissance lente et dont l'autre est caractéristique des poulets à croissance rapide) sur un groupe d'individus déjà important (> 150 poulets) nous permettent d'envisager avec optimisme la distinction entre les deux types de souches de poulets sur une base moléculaire. L'AFLP apparaît cependant comme une technique lourde à mettre en œuvre dans le cadre d'analyses de routine. Elle requiert deux jours de travail pour obtenir un résultat et n'a de sens que sur un ADN de bonne qualité. Sur base des résultats positifs obtenus à ce jour, il nous semble utile de valoriser cette recherche par la mise au point d'un test PCR utilisable en routine par un laboratoire de contrôle (résultat dans la journée). Une utilisation commerciale sous la forme d'un brevet ou de kits d'analyse pourrait également être envisagée.

La spectrométrie dans le proche infrarouge (SPIR) a également démontré le potentiel qu'elle recèle pour distinguer les viandes provenant des deux types de souches. Elle a confirmé la particularité de la viande des poulets à croissance lente et sa teneur plus faible en matière grasse. Contrairement à d'autres viandes (porc, bœuf), cette propriété s'associe chez le poulet à des caractéristiques organoleptiques telles que fermeté et saveur alors chez les poulets à croissance rapide, plus gras, la viande est certes tendre mais souvent peu goûteuse et flasque. Sans émettre de jugement sur la qualité des poulets faisant l'objet de mentions particulières portant souvent sur l'alimentation, les résultats obtenus par SPIR semblent montrer qu'ils ne se distinguent pas particulièrement des poulets à croissance rapide élevés selon des systèmes de production intensifs. Ces produits répondent néanmoins à la demande de certains consommateurs. La conclusion majeure à retirer de ces résultats en concordance avec d'autres études antérieures est que le facteur crucial permettant d'obtenir une qualité différente est le recours à des souches à croissance lente et un abattage plus tardif (au-delà de 81 jours).

A nos yeux, la complémentarité de la SPIR avec les techniques de biologie moléculaire ressort également des résultats de ce travail. Moyennant l'optimisation des modèles de discrimination développés au cours de ce projet, elle pourrait s'intégrer dans un système de contrôle des productions certifiées et limiter le nombre d'analyses par les techniques de biologie moléculaire aux échantillons « douteux ».

Les cahiers des charges régissant les productions certifiées contiennent également des prescriptions strictes concernant l'alimentation des animaux. Essentiellement, il s'agit de ne pas incorporer des farines ou graisses d'origine animale dans les aliments (mesure provisoirement généralisée par la Commission Européenne à l'ensemble des productions de viande) et de ne pas utiliser d'antibiotique comme activateur de croissance.

Les crises de l'ESB (Encéphalopathie Spongiforme bovine) et de la dioxine ont démontré le manque cruel d'outils permettant de garantir une traçabilité complète depuis les matières premières jusqu'aux produits finis. Particulièrement dans le secteur de l'alimentation animale, il nous est apparu extrêmement difficile de connaître la composition (ou formule ouverte) des aliments.

La méthode de référence actuellement utilisée pour la détection de farines animales est la microscopie. Cette technique fastidieuse repose sur l'expérience du manipulateur. Le nombre de matières premières (> 700 références) entrant dans les formulations rend pratiquement impossible la constitution d'une gamme complète d'échantillons d'aliments composés et le développement de modèles basés sur le spectre dans le proche infrarouge pour envisager une distinction entre aliments « label » et « standard ». Par contre, une analyse de l'aliment basée sur l'identification de l'origine des particules qui le constitue est une

alternative qu'il est possible de mettre en pratique grâce à la microscopie couplée à la spectrométrie dans le proche infrarouge. Cette technique nécessite la constitution d'une librairie de spectres prenant en compte la diversité des matières premières mais présente l'avantage d'être moins dépendante de l'expertise du manipulateur.

Actuellement, le contrôle de la présence de substances inhibitrices (antibiotiques ou autres) est réalisé par des tests microbiologiques. Des souches bactériennes de référence sont ensemencées dans des milieux de culture normalisés. L'action inhibitrice d'un aliment est mise évidence par la mesure de la zone d'inhibition développée autour de l'échantillon à tester. Il est clairement apparu lors de ce projet que dans certaines conditions, des inhibitions pouvaient être observées en absence d'un apport frauduleux d'antibiotique. Le développement d'un schéma de sélection microbiologique des échantillons susceptibles de contenir des antibiotiques reste une étape clé dans la détection d'agents antimicrobiens. L'automatisation et l'objectivation de l'interprétation des analyses constituent un enjeu fondamental dans la perspective de l'intensification des contrôles.

Face à cet aspect microbiologique, la mise en place d'analyses multirésidus (par exemple par HPLC), permettant l'identification et le dosage simultanés de plusieurs analytes constitue une voie intéressante de développement. L'utilisation de la fluorescence (directe ou inverse) comme détecteur lors d'analyses chromatographiques ou électrophorétiques (électrophorèse capillaire) permettra d'atteindre des seuils de sensibilité particulièrement bas.

Il reste cependant impératif que ces deux aspects de développement restent intimement liés. Il est en effet illusoire de vouloir confirmer, par méthode analytique classique (un antibiotique, une méthode), tous les échantillons positifs au screening microbiologique si celui présente un taux élevé de faux positifs. D'autre part, le schéma ainsi développé doit être applicable, moyennant l'adaptation de l'extraction, à d'autres matrices d'intérêt comme la viande ou les produits animaux.

D'un point de vue plus global, le programme d'appui scientifique à la recherche prénormative dans le secteur alimentaire visait à stimuler la recherche sur les normes des produits alimentaires dans un contexte de développement durable afin de renforcer l'expertise des centres de recherche. Cet objectif est dans notre cas entièrement rencontré. Ce projet est le prolongement d'un inventaire des produits agricoles et agro-alimentaires attestant des qualités spécifiques<sup>1</sup>. Il a été mené parallèlement à des recherches sur la détection d'organismes génétiquement modifiés<sup>2</sup>. Les résultats obtenus pour les analyses par les techniques spectrométriques dans l'infrarouge proche ont déjà fait l'objet de plusieurs publications. Les recherches menées d'une part sur la détection des antibiotiques dans les aliments et la viande, et d'autre part, sur les déterminants moléculaires caractérisant les souches de poulet à croissance lente sont suffisamment avancées pour également pouvoir faire l'objet de prochaines publications scientifiques.

En fait, le développement de systèmes analytiques de contrôle de l'authenticité des productions agricoles constitue désormais un axe de recherche prioritaire du DÉPARTEMENT QUALITÉ DES PRODUCTIONS AGRICOLES qui tente d'obtenir une reconnaissance au niveau international. Dans cette perspective, le Département coordonne depuis le début de cette

---

<sup>1</sup> Projet de recherche NP/DD/05 – contrat NP/42/005 : Contrôle de l'authenticité des produits agricoles et agro-alimentaires attestant des qualités spécifiques

<sup>2</sup> Projet de recherche NP/DD/024 – contrat NP/42/026 : Traçage et authentification des produits alimentaires à base d'organismes génétiquement modifiés.

année 2001 un projet européen relatif au problème de la détection des farines animales dans l'alimentation du bétail (projet STRATFEED<sup>3</sup>)

Il est à remarquer que ces différents projets sont autant d'exemples de l'approche globale du Département qui tente d'aborder les questions d'authenticité par différentes techniques (PCR, spectroscopie, microscopie classique et microscopie couplée à la spectroscopie dans le proche infrarouge) pour mieux tirer parti de leurs complémentarités.

---

<sup>3</sup> European project n° GRD1-2000-25002 : Strategies and methods to detect and quantify mammalian tissues in feedingstuffs.

## ***Bibliographie***

## 5. Bibliographie

- Barallon, R., Shanahan, D., du Prat, E., Day, J. et Parkes, H. (1996). In *Proc. Food Authenticity 96*, IFR Norwich - U.K.
- Bastiaens, A., Deroanne, C., Carletti, G. et Zayan, R. (1991). In *Proc. 37<sup>th</sup> Int. Cong. Meat Sci. Technol.*, Kulmbach, vol. 1, 37-43
- Bastiaens, A., Deroanne, C., Delvaux, G. et Carletti, G. (1992). In *Proc. 38<sup>th</sup> Int. Cong. Meat Sci. Technol.*, Clermont-Ferrand, France, 325-328
- Behrens M., Unthan M. Brinkmann Y., Buchholz R. et Latus N. (1999). *Fleischwirtschaft* **79**, 97-100
- Biston, R. et Dardenne, P. (1986). In *NIR Users Conf.*, London - U.K.
- Biston, R., Dardenne, P. et Demarquilly, C. (1989). In *Proc. 16<sup>th</sup> Int. Grassl. Congr.*, Nice - France
- Cota-Rivas, M., Vallejo-Cordoba, B (1997). *J. Cap. Elec.* **4**(4) : 195-199
- Cozzolino, D., Murray, I. et Paterson, R. (1996). *J. of Near Infrared Spectrosc.* **4** : 213-223
- Culioli, J., Touraille, C., Bordes, P. et Girard, J.P. (1990). *Arch. Geflügelk.* **53**(6) : 237-245
- Cutting, J.H., Hurlbut, J.A. et Sofos, J.N. (1997). *J. AOAC Int.* **80**(5) :951-955
- Dannau, M. (1999). *Mise au point d'une méthode HPLC par détection fluorimétrique en vue de l'analyse de sulfamides dans des aliments pour animaux.* Travail de fin d'études de la Faculté universitaire des sciences Agronomiques de Gembloux
- Dardenne, P. et Biston, R. (1986). In *ICNIRS Conf Budapest - Hungary*
- de Pedro, E., Garrido, A., Cobo, A., Dardenne, P. et Murray, I. (1994). In *Leaping Ahead with Near Infrared Spectroscopy*, Ed G.D. Batten, P.C. Flinn, L.A. Welsh et A.B. Blakeney. Near Infrared Spectroscopy Group, RACI, North Melbourne, Australia, pp. 291-295
- Deroanne, C., Castermant, B. et Despontin, J.-Ph. (1983). In *Proc. 6<sup>th</sup> Europ. Symp. Poult. Meat*, Ploufragan - France, 28-36
- Downey, G. (1996). In *Proc. Food Authenticity 96*, IFR Norwich - U.K.
- Downey, G. et Beauchêne, D. (1997), *Meat Science* **45**(3), 353
- Downey, G. et Beauchêne, D. (1997), *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* **30**(7), 721
- Feng X.P., Kuhnlein U., Fairfull R.W., Aggrey S.E., Yao J. et Zadworny D. (1998). *J. Hered.* **89**, 355-359
- Fumière, O., Sinnaeve, G., Dardenne, P. (2000). *J. Near Infrared Spectrosc.* **8**, 27-34
- Gallardo, J.M., Sotelo, C.G., Piñeiro, C., Pérez-Martin, R.I. (1995). *J. Agric. Food Chem.* **43** : 1238-1244
- Gandemer, G. (1997). *OCL* **4**(1) : 19-25
- Girard, J.P. (1988). In *Technologie de la viande et produits carnés.* Ed. 1) INRA 2) APRIA 3) Technique et Documentation – Lavoisier Paris.
- Girard, J.P., Culioli, J., Denoyer, C., Berdagué, J.L. et Touraille, C. (1993). *Arch. Geflügelk.* **57**(1) : 9-15

- Hildrum, K., Isaksson, T., Naes, T., Nilsen, B., Roabotten, M. et Lea, P. (1995). *J. Near Infrared Spectrosc.* **3** : 81-87
- Holland, J., Kemsley, E.K. et Wilson, R. (1996). In *Proc. Food Authenticity 96*, IFR Norwich - U.K.
- Knorr C., Cheng H.H. et Dodgson J.B. (1999). *Animal Genetics* **30**, 28-35
- Kocher, T.D., Thomas, W.K., Meyer, A., Edwards, S.V., Pääbo, S., Villablanca, F.X. et Wilson, A.C. (1989). In *Proc. of Natl. Acad. Sci.* **86** : 6196-6200
- Krzanowski, W.J. (1995). *J. of Near Infrared Spectrosc.* **3** : 111-117
- Lassaut, B., Sauvageot, F. et Touraille, C. (1984). *Sci. Aliments* **4** : 33-42
- Leblanc, E.L., Singh, S., Leblanc, R.J. (1994). *J. Food Sci.* **59**(6) : 1267-1270
- Le Boucher, G. (1997). *Filières Avicoles Juillet-Août 1997* : 38-40
- Lefrançois, C., Hänni, C. et Lange, M. (1997). *Biofutur* **165** : 27-30
- Lewis (1997). *Meat Science* **45**(4) : 501-516
- Mary, A. (1998). Convention 2471/2 entre la Région wallonne et la Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux - Unité de Technologie des Industries Agro-alimentaires
- Meirlaen, J.-L. (1992). *Etude de marché et aspect technique et économique du poulet label en Wallonie*. Travail de fin d'études de la Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux
- Meurens, M., Li, W., Foulon, M. et Acha, V. (1994). In *Proc. Authenticity Fruit Juices*, Parma - Italy, 243-251
- Meyer, R., Höfelein, C., Lüthy, J. et Candrian, U. (1995). *J. AOAC Int.* **78** : 1542-1551
- Meyer, R. et Candrian, U. (1996). *Lebensm. Wiss. Technol.* **29** : 1-9
- Moran, J.W., Turner, J.M. et Coleman, M.R. (1995). *J. AOAC Int.* **78**(3) : 668-673
- Murray I. (1998). *Communication personnelle*.
- Osborne, B.G., Mertens, B., Thompson, M et Fearn, T. (1993). *J. of Near Infrared Spectrosc.* **1**, 77-84
- Patel, I., Marshall, K., Williams, C., Othman, H. et Crosby, N. (1994). *Analyst* **119** : 1483-1487
- Rabot, C., Rousseau, F., Dumont, J.P., Rémignon, H. et Gandemer, G. (1996). *Viandes Prod. Carnés* **17**(1) : 17-22
- Rabot, C., Gandemer, G., Meynier, A., Lessire, M. et Juin, H. (1999). *Viandes Prod. Carnés* **20**(3) : 93-97
- Rabot, C., Gandemer, G., Juin, H., Meynier, A. et Lessire, M. (1999). *Viandes Prod. Carnés* **20**(3) : 97-100
- Rannou, H. et Downey, G. (1997). *Analytical Communications* **34**, 401
- Rémignon, H. et Culioli, J. (1995). In *Proc. 12<sup>th</sup> Europ. Symp. Poult. Meat*, Zaragoza, 145-150
- Sauveur, B. (1997). *INRA Prod. Anim.* **10**(3) : 219-226
- Scotter, C.N.G. et Legrand, A. (1994). In *Proc. Authenticity Fruit Juices*, Parma - Italy, 253-270
- Simeonidou, E., Botsoglou, N., Posmas, I. et Fletouris, D. (1996). *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* **19**(4) : 2349-2364

- Sindic, M., Chevalier, O., Dardenne, P. et Deroanne, C. (1993). *Viandes et Produits Carnés* **14**(4) : 95-98
- Siriex, A. et Downey, G. (1993). *J. Near Infrared Spectrosc.* **1** : 187-197
- Tanaka M., Hosokawa Y., Watahiki M. et Nakashima K. (1992). *Gene* **112**, 235-239
- Thyholt, K., Indahl, U.G., Hildrum, K.I. et Ellekjær, M.R. (1997). *J. of Near Infrared Spectrosc.* **5**, 195-208
- Thyholt, K., Isaksson, T., Hildrum, K., Ellekjær, M.R. et Eide, Ø.C. (1998). *J. of Near Infrared Spectrosc.* **6**, A361-A362
- Toorop, R. M., Murch, S.J. et Ball, R.O. (1997). *Food Research International* **30**(8) : 619-627
- Touraille, C., Ricard, F.H., Kopp, J., Valin, C., Leclercq, B. (1981). *Arch. Geflügelk.* **45** : 97-104
- Touraille, C., Lassaut, B. et Sauvageot, L. (1985). *Viandes Prod. Carnés* **6**(2) : 67-72
- Twomey, M., Downey, G. et Mc Nulty, P.B. (1995). *J. Sci. Food. Agric.* **67** : 77-84
- Unsel, M., Beyermann, B., Brandt, P. et Hiesel, R. (1995). *PCR Methods Appl.* **4** : 241-243
- Van der Horst, F. (1988). *La production de poulet de chair*. Editeur : ITAVI (Paris)
- Van der Horst, F. *Fiches techniques : volailles fermières*. Editeur : ITAVI (Paris)
- Van Wijnsberghe, D. (1994). *Dosage des sulfamides dans le lait par chromatographie liquide haute performance avec dérivatisation pré-colonne à la fluorescamine*. Travail de fin d'étude de l'Institut Supérieur Industriel Huy-Gembloux-Verviers
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J. Peleman J., Kuiper M., Zabeau M. (1995). *Nucl. Acids Res.* **23**, 4407-4414
- Zimmermann, S., Zehner, R. et Mebs, D. (1998). *Fleischwirtschaft* **78**(5) : 530-533