



Analyses E. coli et recherche d'espèce, mêmes principes ?

Françoise Le Vacon
7ème journée Steakexpert - Avrillé

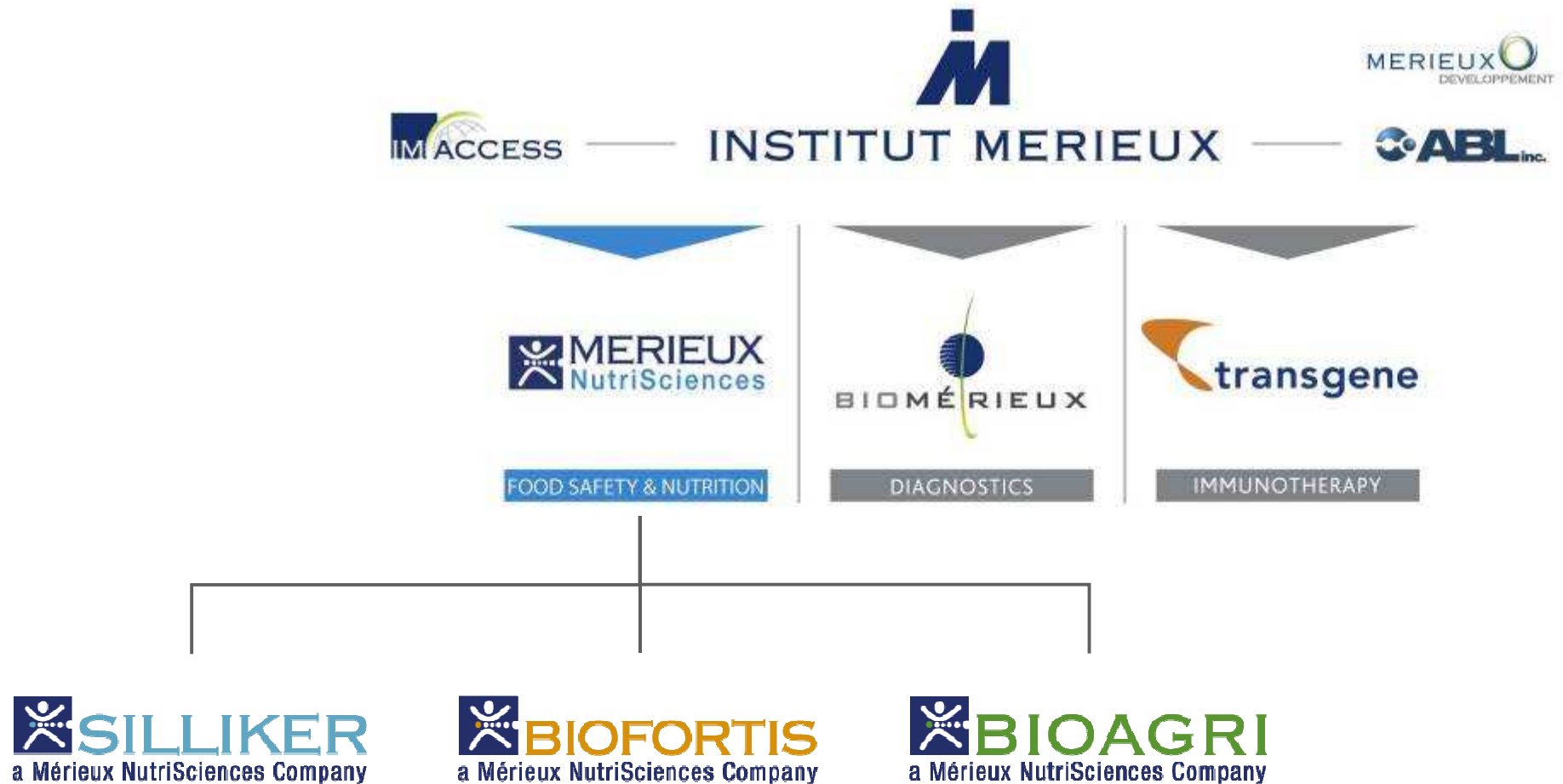


Sommaire

- **Biofortis, a Mérieux NutriSciences Company**
- **Étiquetage des espèces animales**
 - Contexte, Réglementation, Obligations, Conséquences
- **E. coli / espèces animales : trouver l'ADN !**
- **Bilan analytique de la crise : stratégie à adopter**



Une société de l'Institut Mérieux





Mérieux NutriSciences

➔ Plus de 4000 professionnels à travers le monde





BIOFORTIS

- 150 collaborateurs, siège à Nantes (France)
- 3 activités principales
 - **BioAnalytique**
 - **Clinique (CRO dédiée aux essais cliniques en nutrition)**
 - **Sensoriel / Consommateur (tests produit, panels expert, etc.)**

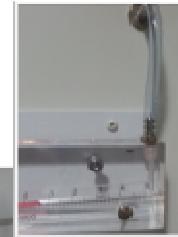




BIOFORTIS

- BioAnalytique

- Echantillons Biologiques
- Analyse de microflores (identification, génotypage, monitoring de flore complexe)
- Echantillons agro-alimentaires
- OGM
- Allergènes
- Identification d'espèces Animales



1-2317

Portée détaillée sur www.cofrac.fr





Sommaire

- Biofortis, a Mérieux NutriSciences Company
- **Espèces animales / E. coli: Contexte de crise**
- **E. coli / espèces animales : trouver l'ADN !**
- **Bilan analytique de la crise : stratégie à adopter**



Qualité des aliments...

Les risques d'origine alimentaire portent généralement sur

Dangers microbiologiques

Dangers chimiques

(pesticides, résidus de médicaments et autres contaminants, additifs alimentaires,...)

OGM, allergènes

Falsification des produits



FOOD AND AGRICULTURE
ORGANIZATION
OF THE UNITED NATIONS

Nombreux points de la chaîne alimentaire sont concernés

Occurrence difficile et coûteuse à vérifier.

[FAO - « renforcement des systèmes nationaux de contrôle alimentaire »]



Les enjeux

→ Économique

- Coût des matières premières

→ Religieux

- nouveaux marchés alimentaires (export ou domestique)
- Détection porc dans les aliments halal et kasher

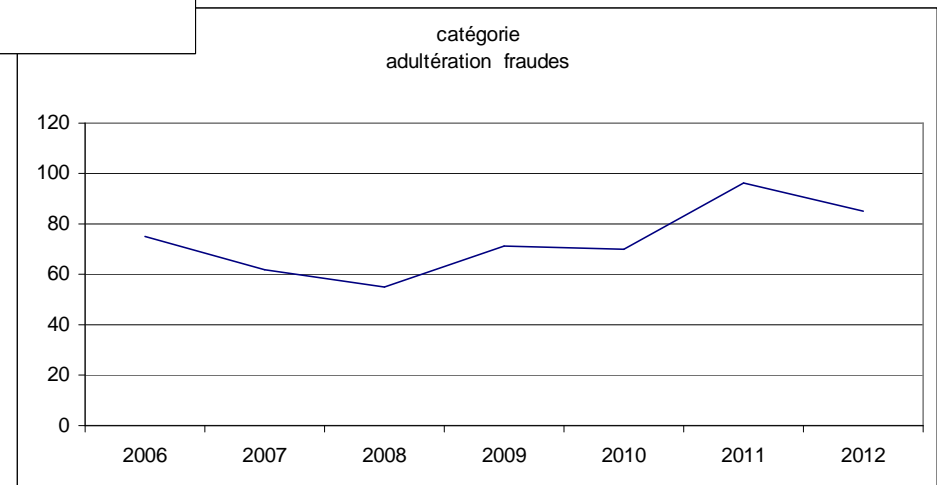
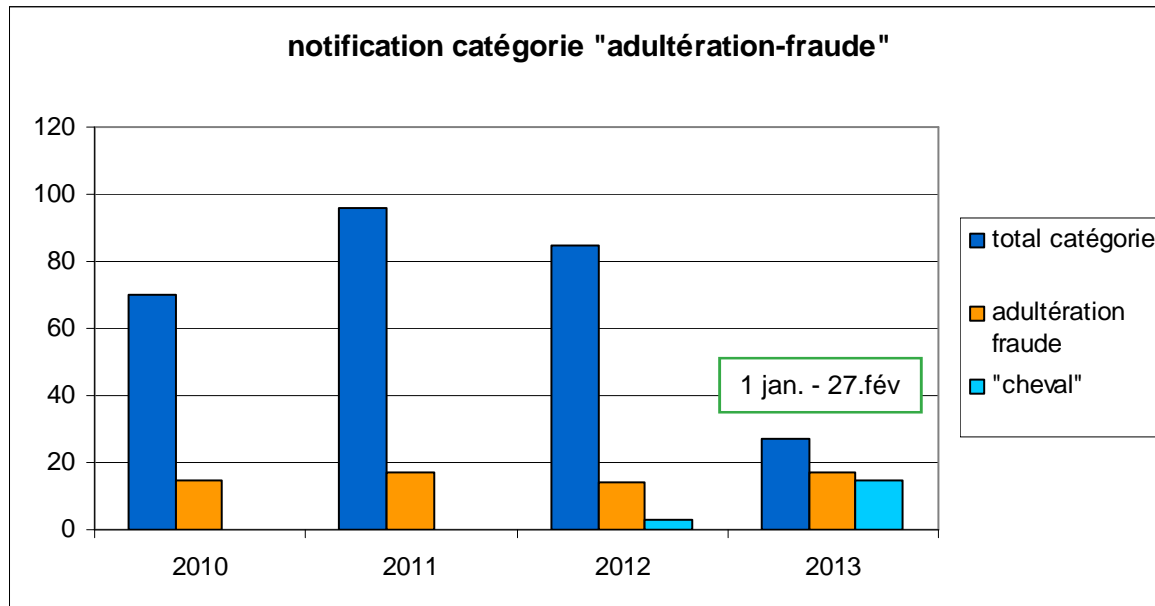
→ Risque de fraudes

→ Risque de contamination accidentelle



Fraude et falsification....Notifiable ?

Les notifications « viande de cheval » classées en « adultération »





Conséquences

Pertes économiques

Scandale du cheval: les ventes de surgelés au bœuf en baisse de 45%
Le Progrès 25/02/2013



Confiance des clients et consommateurs

Viande de cheval: les consommateurs boudent l'ensemble des plats surgelés
La Figaro 25/02/2013

Le marché des plats préparés a accusé une baisse des ventes de 20%
La Tribune 22/02/13



L'ensemble de la filière est concernée !

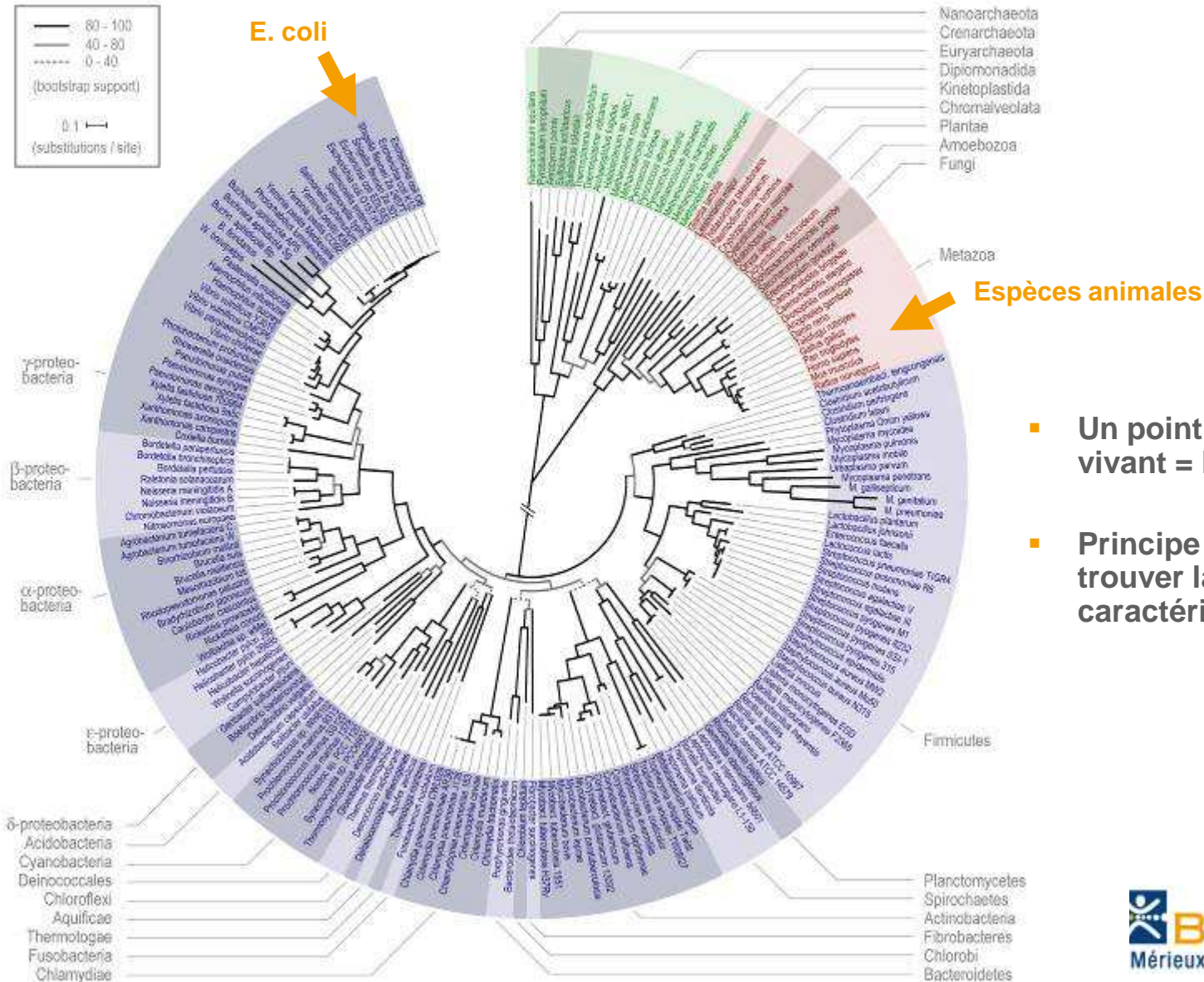


Sommaire

- Biofortis, a Mérieux NutriSciences Company
- Étiquetage des espèces animales
 - Contexte, Réglementation, Obligations, Conséquences
- **E. coli / espèces animales : trouver l'ADN !**
- Bilan analytique de la crise : stratégie à adopter



E. coli / espèces animales : trouver l'ADN !



- Un point commun du règne vivant = l'ADN
- Principe de l'analyse = trouver la séquence ADN caractéristique de la cible



E. coli / espèces animales : trouver l'ADN !

→ Une démarche analytique différente

- **E. coli = microorganisme vivant pouvant se multiplier**
 - Possibilité d'enrichissement de l'échantillon
 - Possibilité d'isolation pour confirmation
- **Espèces animales = présence de tissus**
 - Impossibilité d'enrichissement
 - Impossibilité d'isolement ?
 - Tissus de natures différentes possibles

→ 2 principaux traceurs

- **Protéine**
 - Type protéines et teneur matrice-dépendante
 - Effets matrice / procédé
 - > risque +++ de faux-négatifs par inhibition
 - > faux-positifs par cross-réaction
- **ADN**
 - Teneur matrice-dépendante mais analyte ubiquiste (viande, lait, graisse, etc.)
 - Effets matrice / procédé
 - > risque + de faux-positifs par cross-contamination (haute sensibilité !)
 - > faux-positifs faible (haute spécificité)



Détection Animale par PCR

- **Process analytique d'analyse par Biologie Moléculaire**

- 1. Réception de l'échantillon / login**

2. Homogénéisation de l'échantillon

3. Extraction de l'ADN / Dosage de l'ADN

4. Analyse biologie moléculaire

5. Interprétation / Résultat

*Réception
échantillon*



Points critiques (client)

- **taille/nombre d'échantillons**
- **Méthode d'échantillonnage**



Détection Animale par PCR

▪ **Process analytique:**

1. Réception de l'échantillon / login
2. Homogénéisation de l'échantillon
3. Extraction de l'ADN / Dosage de l'ADN
4. Analyse Biologie Moléculaire
5. Interprétation / Résultat



*Réception
échantillon*

*Broyage /
Homogénéisation*



Points critiques (labo)

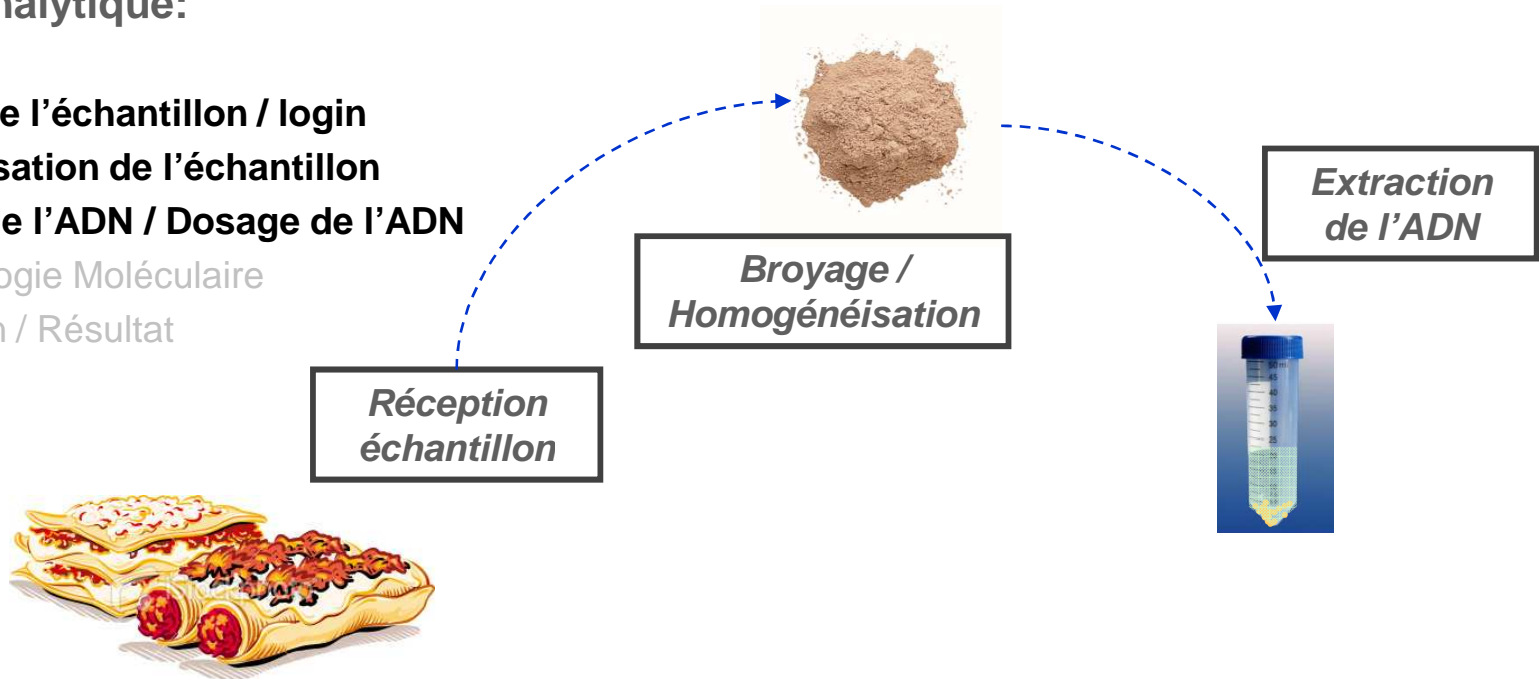
- Homogénéisation



Détection Animale par PCR

Process analytique:

1. Réception de l'échantillon / login
2. Homogénéisation de l'échantillon
3. Extraction de l'ADN / Dosage de l'ADN
4. Analyse Biologie Moléculaire
5. Interprétation / Résultat



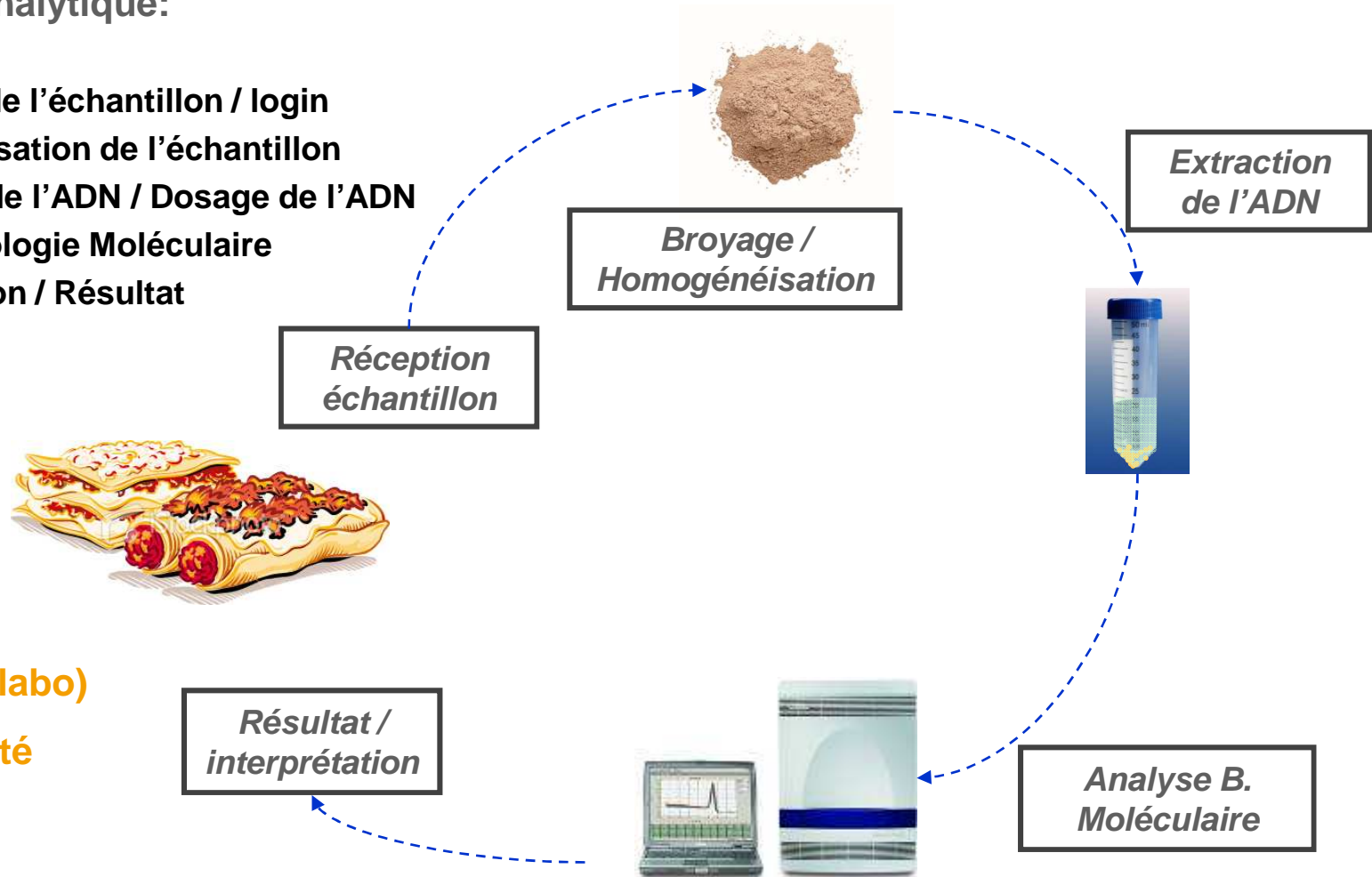
Points critiques (labo)

- quantité / qualité ADN

Détection Animale par PCR

Process analytique:

1. Réception de l'échantillon / login
2. Homogénéisation de l'échantillon
3. Extraction de l'ADN / Dosage de l'ADN
4. Analyse Biologie Moléculaire
5. Interprétation / Résultat



Points critiques (labo)

- Contrôles Qualité



PCR migration sur gel - RFLP Multiplex

Restriction Fragment Length Polymorphism Analyse qualitative multiplexée

→ 1ère étape

- Extraction ADN génomique

→ 2ème étape

- Amplification par PCR d'une séquence connue d'ADN (et commune à toutes les espèces) en plusieurs milliers d'exemplaires

→ 3ème étape

- Restriction enzymatique des produits PCR (coupure) en fonction de la séquence (de l'espèce)

→ 4ème étape

- Séparation des fragments sur gel d'agarose
- Identification des bandes caractéristiques





PCR migration sur gel - RFLP Multiplex

Restriction Fragment Length Polymorphism

dans les produits carnés

- Chèvre (*Capra hircus*),
- Bœuf (*Bos taurus*),
- Porc (*Sus scrofa*),
- Cheval (*Equus caballus*),
- Mouton (*Ovis aries*),
- Poulet (*Gallus gallus*),
- Dinde (*Meleagris Gallopavo*),
- Oie (*Anser anser*),
- Canard (*Anas platyrhynchos*
or *Anas platyrhynchos* X *Cairina moschata*)

dans les produits laitiers

- Chèvre (*Capra hircus*),
- Bœuf (*Bos taurus*),
- Mouton (*Ovis aries*),
- Bufflonne (*Bubalus bubalus*)





Identification par QPCR

real-time Polymerase Chain Reaction (qPCR)

Analyse qualitative / semi-quantitative

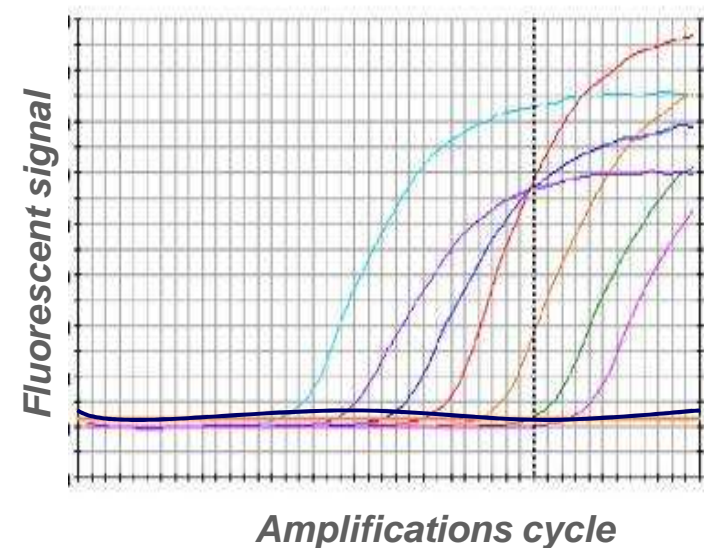
→ **1ère étape**

- Extraction ADN génomique

→ **2ème / 3ème étapes simultanées**

- Amplification par PCR d'une séquence connue d'ADN (et spécifique d'1 espèce) en plusieurs milliers d'exemplaires
- Emission de fluorescence proportionnelle à l'amplification (si fluorescence = présence de la cible)

Remarque : Approche semi-quantitative possible car fluorescence liée à la quantité initiale de cible





Identification par QPCR

Real-time Polymerase Chain Reaction (qPCR)

Applicable à toutes matrices (viande, lait, produits finis, sous-produits, échantillons environnementaux)

- Chèvre (*Capra hircus*),
- Bœuf (*Bos taurus*),
- Porc (*Sus scrofa*),
- Cheval (*Equus caballus*),
- Mouton (*Ovis aries*),
- Poulet (*Gallus gallus*),
- Dinde (*Meleagris Gallopavo*),
- Oie (*Anser anser*),
- Canard (*Anas spp*, *Cairina moschata*)
- Chevreuil (*capreolus capreolus*)
- Cerf (*Cervus elaphus*)
- Daim (*Dama dama*)





Détection Animale par PCR en temps réel: approche semi-quantitative

Principe de l'approche semi-quantitative

- **Constitution de matériaux de référence internes contaminés en masse**

Ex. 0.1g de viande de cheval dans 99.9g de bœuf = contrôle 0,1%

- **Extraction des ADN et analyses simultanées échantillons / points de référence**

- Difficulté d'établir une « relation simple » entre quantité d'ADN et masse de l'ingrédient :
 - variation liée au type de tissus, à la teneur en eau
- NB : les résultats sont liés aux matériaux de référence

- **Résultat rendu sur l'échantillon par rapport aux points de référence**

Ex. 1 : ADN cible détecté à une intensité de signal correspondant à un niveau de contamination estimé de 0,1 à 1% (masse/masse)

Ex. 2 : ADN cible détecté à une intensité de signal correspondant à un niveau de contamination estimé supérieure à 5%, 25%, 50% (masse/masse)



E. coli / espèces animales : trouver l'ADN !

→ Quelle méthode d'analyse ADN ?

- Toutes les familles de la biologie moléculaire sont utilisables

	Hybridation (ex. puce ADN)	Fingerprint (ex. RFLP)	qPCR (ex. PCR cheval UE)	qPCR semi- quantitative	Séquençage total
Technicité	+	++	+	+	+++
Multiplexage	++ (> 20 sp.)	+ (~10 sp.)	-	-	+++ (toutes sp.)
Robustesse	+	+/-	++	+	++
Limite de détection	0,1 - 1%	0,1 - 1%	0,01 à 0,1%	~ 0,1%	~ 0,1%
Résultats	Qualitatif	Qualitatif	Qualitatif	Semi- quantitatif	Semi- quantitatif
Coût	€	€	€	€€	€€€€



Sommaire

- Biofortis, a Mérieux NutriSciences Company
- Étiquetage des espèces animales
 - Contexte, Réglementation, Obligations, Conséquences
- E. coli / espèces animales : trouver l'ADN !
- Bilan analytique de la crise : stratégie à adopter



Bilan de la crise et stratégie analytique

→ Bilan analytique de la crise

- **Avant**
 - Analyse ponctuelle
 - Analyse cible par cible
 - Un domaine d'analyse poussée sur problématique confessionnelle (halal, kacher)

- **Pendant**
 - Une urgence = le cheval
 - Des interrogations sur d'autres espèces
 - Un travail sur les pratiques d'échantillonnage, de contrôle

- **Et maintenant ?**
 - Un consommateur à rassurer ?
 - Une multiplication des contrôles ? Des analyses ? Des surcoûts !



Bilan de la crise et stratégie analytique

→ Une adaptation nécessaire de la stratégie analytique

- **Espèces animales / OGM = une même stratégie (toutes proportions gardées !)**
 - Pour rationaliser le plan de contrôle et limiter les coûts
 - Pour garantir et se prémunir

- **1ère étape = HACCP**
 - Ne pas analyser tout....mais analyser bien !

- **2ème étape = criblage**
 - Analyse qualitative sur espèces à risque
 - Ex. classique sur matrice bœuf = porc + cheval + poulet + dinde + mouton

- **3ème étape = évaluation du problème par Analyse semi-quantitative si positif**
 - < 0,1 % = Cross-contamination environnementale?
 - 0,1 – 1 % = Présence fortuite ? Problème d'outsourcing ?
 - > 1 % = Erreur ? Fraude ?



Conclusion E coli/ Analyses espèces

- ➔ **Un risque sanitaire et un risque de fraude sont parfois traités de façon proche**
 - Interlocuteurs dans les entreprises
 - Perception media et perception consommateur
 - Position des services officiels et notification
 - Règles (Ethiques?) en matière de transmission des résultats

- ➔ **Des principes d'analyses proches mais avec de vraies différences**
 - Cultivabilité des microorganismes pathogènes
 - Détectabilité des fragments ADN après process
 - Des techniques de détection ADN multiples nécessitant une expertise pour l'interprétation

- ➔ **Des principes identiques pour monter un plan de contrôle efficace**
 - Analyse des risques
 - Ciblage des prélèvements
 - Expertise analytique
 - Interprétation technique et technologique des résultats



➔ **Merci de votre attention**