

Procédures d'analyses de la composition de produits destinées à l'alimentation humaine ou animale

B. LEBEAU, A. LOSTANLEN, E. CADORET, M. PRIN, J.P. MOISAN, F. LE VACON
Laboratoire ATLANGENE APPLICATIONS, Institut de Biologie, 44093 Nantes Cedex 1

RESUME - Le laboratoire ATLANGENE APPLICATIONS, spécialiste de l'identification génétique, travaille essentiellement sur l'ADN. Cette molécule est le support de toutes les techniques de biologie moléculaire (PCR, Séquençage, PCR en temps réel). Elle présente comme caractéristique principale d'être extractible de tout produit biologique qu'il soit brut ou transformé. Deux tests moléculaires ont été développés : PCR multiplex animale et la Quantification de Végétaux Génétiquement Modifiés (V.G.M.). Le premier authentifie simultanément 5 espèces animales (bœuf, porc, mouton, dinde, poulet) susceptibles d'être présents dans l'alimentation humaine et animale. Le deuxième quantifie des V.G.M. tels que maïs ou soja dans tout produit contenant ces plantes à l'état brut ou leurs dérivés. Ces deux procédures d'analyses ont été développées pour répondre aux interrogations des fabricants et consommateurs. Elles s'intègrent dans une démarche qualité afin de respecter les normes en vigueur dans la communauté européenne.

Human and animal food origin label

B. LEBEAU, A. LOSTANLEN, E. CADORET, M. PRIN, J.P. MOISAN, F. LE VACON
Laboratoire ATLANGENE APPLICATIONS, Institut de Biologie, 44093 Nantes Cedex 1

SUMMARY - ATLANGENE APPLICATIONS laboratory is specialized in genetic identification. All of our tests are made on DNA using the most recent technologies in molecular biology. DNA can be extracted from any biological product. We have mainly developed two functional molecular tests : Multiplex PCR and Genetically Modified Vegetals (G.M.V.) Quantification. Multiplex PCR is able to simultaneously identify 5 different animal species that can be found in any food. The second one is made to quantify G.M.V. such as maize or soybean in any product containing these vegetals either modified or not. Both these test have been developed in order to meet the expectations of the industrials and consumers. They perfectly integrate quality approach to be in accordance with european standard commission.

INTRODUCTION

A l'aube du III^e millénaire, les éleveurs, industriels et consommateurs sont soucieux de l'origine des produits qu'ils utilisent : que ce soit pour tracer un bovin tout au long d'une chaîne de production, déterminer la composition d'un produit carné, vérifier les mentions d'étiquetage.

Les législations françaises et européennes imposent des normes de plus en plus strictes en terme de traçabilité des produits alimentaires. Les plus récentes techniques de biologie moléculaire utilisées au laboratoire et développées notamment par ATLANGENE APPLICATIONS permettent d'authentifier un produit alimentaire d'origine animale ou végétale.

1. METHODE

L'électrofocalisation des protéines (H. Rehbein *et al.*, 1995) ou l'utilisation d'anticorps spécifiques (L.J. Gleeson *et al.*, 1983) constituent des méthodes fiables d'identification des espèces animales, mais restent pour la plupart inopérantes lorsque le produit est cuit. La molécule d'ADN présente la caractéristique d'être thermostable et de fait plus résistante que les protéines aux procédés industriels.

Nous avons montré que même sur un produit transformé nous pouvons déterminer l'origine de l'ADN présent.

1.1. EXTRACTION D'ADN

Une veille technologique très poussée et la maîtrise des technologies de pointe nous a permis de mettre au point un tampon d'extraction pouvant extraire l'ADN d'un produit brut (grains de maïs, soja, colza...), d'un produit transformé simple (amidon de maïs, protéine de soja...) et complexe (Corn gluten, Tourteaux, Plats cuisinés...).

Des colonnes spécifiques de l'ADN permettent de récupérer une quantité suffisante d'ADN pour être exploitée par les technologies de pointe pour étudier cette molécule (PCR : Polymerase Chain Reaction, Séquençage...).

L'ADN extrait est dosé par une méthode fluorimétrique très sensible, utilisant un agent intercalant spécifique de l'ADN double brin.

Nos études montrent que dans des produits ayant subi des procédés technologiques (broyage, étuvage, pasteurisation, stérilisation...), les fragments d'ADN amplifiables n'excédaient pas 300 pb (paires de bases). Nous travaillons depuis sur des amplicons (résultat de l'ADN amplifié) de moins de 200 pb.

1.2. LA PCR : POLYMERASE CHAIN REACTION

La combinaison de l'enzyme Taq Polymérase et d'amorces spécifiques permet par la méthode de PCR d'amplifier spécifiquement un fragment d'ADN.

Trois étapes peuvent être décrites pour expliquer ce processus :

- la première consiste à dénaturer à 95°C l'ADN bicaténaire (double brin) en ADN monocaténaire (simple brin) ;
- la deuxième permet d'hybrider les amorces spécifiques sur l'ADN simple brin ;
- la dernière étape est une élongation de l'ADN natif à partir des amorces qui duplique cette molécule.

Cette amplification est exponentielle ce qui donne en fin de réaction une grande quantité d'ADN homologue qui sera facilement analysable.

1.3. LA PCR EN TEMPS RÉEL

La PCR en temps réel est la dernière technologie développée sur le principe de la PCR. Par intégration d'une sonde spécifique fluorescente, en plus des amorces oligonucléotidiques, on peut suivre sous forme de graphique l'évolution de l'amplification d'ADN à partir d'une quantité connue.

Tous les résultats sont analysés directement par un logiciel qui nous donnera des constantes d'amplification. Grâce à ces paramètres il est alors possible de quantifier avec précision (très grande reproductibilité) et une très grande sensibilité (1 équivalent génome) l'ADN extractible dans un produit.

Cette technologie élimine toutes les étapes post-PCR évitant à 100 % les sources de contaminations des échantillons par des amplicons.

2. RÉSULTATS

2.1. DÉTECTION D'ESPÈCES ANIMALES DANS UN PRODUIT ALIMENTAIRE

Nous avons pu, à partir des séquences nucléotidiques spécifiques du bœuf (*Bos taurus*), porc (*Sus scrofa*), mouton (*Ovis aries*), dinde (*Meleagris gallopavo*) et poulet (*Gallus gallus*), réaliser une PCR multiplex performante. Au cours de sa mise au point, nous avons défini des produits d'amplification spécifiques de petites tailles, inférieures à 200 paires de bases (pb), pour détecter la présence de l'ADN des cinq espèces, même dégradé. Quarante autres espèces animales ont été testées, dont le cheval, le chien, le lapin, le buffle, le bison, la pintade, l'autruche..., montrant l'absence de réaction croisée inter-espèces. Pour chacune des espèces recherchées, toutes les races ou souches sont détectées (exemple 26 races bovines ont été contrôlées). Des essais prouvent que la technique possède un seuil de sensibilité qui assure la détection d'au moins 1 % du produit d'origine animale (viande, poudre d'os, poils, plume...).

La reproductibilité, la sensibilité et la fiabilité du test ont été éprouvées. Qu'il s'agisse de l'analyse de produits bruts (viande, peau, poils...), ayant subi une procédure industrielle de transformation et/ou de composition complexe (mélange d'espèces), la détection reste possible (voir le tableau n° 1), offrant ainsi un nouveau moyen de contrôle, efficace et fiable, de la conformité des produits alimentaires.

Tableau n° 1
Résultats obtenus sur divers produits d'origine animale

Description	Composition annoncée	Espèces détectées
Poudre d'os	Bœuf	Boeuf
Farine de viande	Bœuf/Porc	Bœuf/Porc
Cuir	inconnue	Boeuf
Laine	inconnue	Mouton
Bonbon	Gélatines de Porc/Bœuf	Porc/Boeuf
Ravioli	Bœuf	Boeuf
Ravioli	Bœuf/Porc	Bœuf/Porc
Quenelle	Bœuf/Volaille	Bœuf/Dinde
Couscous	Bœuf/Mouton/Volaille	Bœuf/Mouton/Poulet

2.2. QUANTIFICATION DES VÉGÉTAUX GÉNÉTIQUEMENT MODIFIÉS

Grâce aux recherches bibliographiques qui précèdent de nombreux tests pour déterminer les meilleurs couples d'amorces oligonucléotidiques, nous avons déterminé les cibles spécifiques pour détecter et quantifier des Végétaux Génétiquement Modifiés (V.G.M.).

Les cibles choisies pour cribler la présence de V.G.M. sont le promoteur 35S de la mosaïque du chou fleur (présent dans toutes les constructions autorisées) et le terminateur nos (*Bacillus thuringiensis*) représentatif de quelques V.G.M. Nous concluons alors si le produit analysé contient ou non un V.G.M.. Cette spécificité couplée avec des témoins plantes, des témoins exogènes, des contrôles internes nous permettent de quantifier avec précision un V.G.M.

Ce test a été développé sur un appareil ABI 7700 (PE Biosystems S.A. France). Cette nouvelle technologie permet de réaliser des PCR en temps réel grâce à des sondes internes spécifiques fluorescentes. Ce nouveau concept permet d'éliminer toutes les phases d'analyses post-PCR et surtout permet d'augmenter le seuil de détectabilité des fragments d'ADN spécifiques amplifiés.

Le seuil de détection du test a été déterminé grâce à des gammes de dilution d'ADN dosé extrait de produits bruts et transformés, transgéniques ou non. Ce seuil est très bas, nous quantifions 10 pg (10⁻¹² gramme) d'un transgène.

Les résultats d'une analyse V.G.M. peuvent être exprimés en :

- pourcentage de transgène/ADN total extractible dans un produit simple,
- pourcentage de transgène/ADN de plantes (maïs ou soja) extractible dans un produit complexe.

Cette méthode que nous avons mise au point permet la quantification d'un V.G.M. dans un produit brut ou transformé.

CONCLUSION

Ces deux procédures d'analyses exploitées ensemble ou séparément permettent aux industriels de contrôler leurs produits et ainsi de fournir aux consommateurs des produits de qualité en accord avec les législations actuelles et futures.

Le laboratoire développe également depuis cinq ans, une banque de données, unique en Europe, regroupant des séquences nucléotidiques de 1000 espèces animales (mammifères, oiseaux, poissons). Le champ d'investigation est considérablement élargi. Après séquençage d'un échantillon inconnu, la comparaison de sa séquence dans la base de don-

nées identifie l'origine animale du produit (A. Løstang *et al.*, 1999). Cette banque de données, en perpétuelle augmentation, est en cours d'adaptation afin d'être compatible à la nouvelle technologie des « puces à ADN ».

Principaux partenaires : Ministères de l'Agriculture et de la Recherche, CTSCCV, CTCPA, Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, INSERM, INRA, CRNH, IFREMER.

H. Rehbein, M. Etienne, M. Jerome, T. Hattula, B. Knudsen, F. Jessen, J.B. Luten, W. Bouquet, I.M. Mackie, A.H. Ritchie, R. Martin and R. Mendes, 1995. Food Chemistry, 52 : 193-197.

L.J. Gleeson, W.J. Slattery, A.J. Sinclair, 1983. Aust. Vet. J., 60 : 127-128.

A. Løstang, M.G. Le Roux, M. Etienne, H. Loreal, J.P. Moisan, F. Le Vacon, 1999. Sciences des aliments, vol 19, n°5.