

# Résidus et contaminants des denrées alimentaires : 25 ans de progrès dans leur analyse

## I. Evolution de la stratégie de contrôle

MAGHUIN-ROGISTER G.

Laboratoire d'Analyse des Denrées alimentaires (LADA)

Centre d'Analyse des Résidus en Traces (CART), Département des Sciences des Denrées alimentaires, Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège, Boulevard de Colonster, 20 - bât. B43b, 4000 Liège

Texte d'une conférence donnée le 11 mai 2005 dans le cadre de la célébration des 25 ans d'existence du Laboratoire d'Analyse des Denrées alimentaires, de l'Université de Liège. Les diapositives des exposés sont disponibles sur le site de la section Wallonie-Bruxelles de la WAVFH (*World Association of Veterinary Food Hygienists*) : <http://www.wavfh.ulg.ac.be/>

Correspondance : Prof. G. MAGHUIN-ROGISTER  
g.maghuin@ulg.ac.be

**RESUME** : L'évolution du contrôle des résidus et des contaminants dans les denrées alimentaires, sur une période de 25 ans, est présentée, dans ses aspects législatifs, techniques (analyses de laboratoire) et stratégiques. De nombreuses dispositions législatives au niveau européen, directives, règlements et décisions, ont vu le jour surtout depuis la fin des années'90. L'évolution des techniques d'analyse a été spectaculaire allant des bio-essais sur animaux de laboratoire pour le contrôle des hormones aux méthodes physicochimiques les plus sophistiquées basées sur la spectrométrie de masse en passant par les bio-essais in vitro sur cellules génétiquement modifiées en culture. Le développement de la recherche dans ce secteur est essentiel afin de mieux protéger la santé des consommateurs et des animaux de production, l'environnement, pour lutter contre les fraudes et ainsi assurer le contrôle de la conformité des aliments aux règlements en vigueur.

### INTRODUCTION

L'analyse des denrées alimentaires est nécessaire afin de garantir la maîtrise de la qualité (ou de la conformité) d'un point de vue sanitaire ou purement commercial (garantie des labels par exemple). Elle apparaît indispensable dans le cadre des contrôles exercés par l'autorité compétente, mais d'avantage encore aujourd'hui, dans le cadre de l'autocontrôle au sein des entreprises. C'est une des conditions importantes de la libre circulation des marchandises en particulier au sein du grand marché européen. Ces résultats doivent cependant être interprétés à la lumière d'une législation adéquate afin d'éviter des entraves à la libre circulation voire un protectionnisme mal

venu vis-à-vis de pays tiers lorsque les mesures de blocage ne sont pas entièrement justifiées par des raisons de sécurité sanitaire bien établies sur le plan scientifique.

Même si les risques chimiques sont moins importants, pour leurs conséquences immédiates, que certains risques microbiologiques, les résidus et les contaminants dans les denrées méritent néanmoins une grande attention dans le contrôle puisqu'en 2002, par exemple, ils étaient à l'origine de 61 % des alertes rapides lancées par la Commission européenne (European Commission, 2006).

Trois types de situations peuvent se présenter :

1. mesurer avec précision une concentration en résidus par rapport à une norme légale (p.ex. : limite maximale de résidus – LMR – pour un médicament à usage vétérinaire). Cette situation requiert des méthodes d'analyse quantitative ;
2. identifier avec certitude un composé connu qui ne devrait pas être présent (p.ex. : résidus de substances interdites tel que le chloramphénicol). La Commission européenne (CE) fixe maintenant pour ces composés un niveau minimum de performance requise (MRPL : *Minimal Required Performance Level*) que doivent atteindre les laboratoires qui veulent analyser officiellement ce type de résidus (Directive 96/23/CE, déci-

sion de la Commission 2002/657/CE). Cette situation requiert des méthodes d'analyse qualitative ;

3. dépistage de substances interdites ou non autorisées (p.ex. : hormones anabolisantes) en ignorant au départ leur nature. Dans ce cas où un grand nombre de substances, connues ou inconnues, est possible, de nouvelles approches analytiques sont nécessaires (méthodes biologiques ou biochimiques) afin, non plus d'identifier une substance chimique particulière, mais plutôt un ensemble de substances douées d'activités biologique, pharmacologique ou toxique, telles que des antibiotiques, des hormones sexuelles, des dioxines...

### EVOLUTION DE LA LÉGISLATION RELATIVE AUX RÉSIDUS ET CONTAMINANTS DANS LES DENRÉES ALIMENTAIRES D'ORIGINE ANIMALE

Les principales directives européennes depuis le début des années'80, concernaient principalement l'interdiction des hormones anabolisantes et de substances apparentées. Il a fallu attendre le début des années'90 pour disposer d'un texte relatif aux médicaments à usage vétérinaire chez les animaux sources de denrées alimentaires (tableau I).

Le règlement CEE n° 2377/90 définit les limites maximales de résidus

(LMR). Il comporte quatre annexes :

- annexe I : substances à LMR définitive ;
- annexe II : substances sans risques (LMR inutile) ;
- annexe III : substances à LMR provisoire ;
- annexe IV : substances interdites (risque pour le consommateur).

La directive 96/23/CE constitue la base du contrôle. Elle reprend entre autres, la liste des substances à surveiller. Dans l'annexe I de la directive, le groupe A comprend les substances interdites (hormones et substances apparentées, substances de l'annexe IV du règlement CEE n° 2377/90) ; le groupe B contient les substances autorisées comme médicaments vétérinaires (antibiotiques, anthelminthiques, tranquillisants...) et les contaminants (organochlorés, éléments chimiques, toxines...).

Dans la législation belge, la loi du 15 juillet 1985 relative à l'interdiction des substances à activité hormonale et anti-hormonale (loi du 15/07/1985) et les arrêtés royal et ministériel d'octobre 1997 (AR du 8/09/1997, relatif aux mesures en matière de commercialisation des animaux d'exploitation en ce qui concerne certaines substances ou résidus de substances pharmacologiquement actives, et son arrêté d'exécution l'AM du 10/09/1997) définissant le statut H (pour hormones) et R (pour résidus) constituent les textes les plus importants.

Cette législation est complétée par une série de décisions de la Commission qui ont évolué au cours du temps (tableau II) pour aboutir à la décision 2002/657/CE qui concerne les performances des méthodes analytiques pour l'ensemble des résidus et contaminants et l'interprétation des résultats. Enfin une série de règlement et directives concernent les dioxines (règlement (CE) n°2375/2001, directive 2003/57/CE, directive 2004/44/EC, directive 2002/69/EC (2002/70/EC)).

### LABORATOIRES DE CONTRÔLE

La directive 96/23/CE consacre une hiérarchie des laboratoires de contrôle :

- les laboratoires communautaires

**Tableau I. Principaux textes législatifs européens relatifs aux résidus d'hormones et de médicaments à usage vétérinaire.**

Document	Objet
Directive 81/851/CEE	Médicaments vétérinaires
Directive 81/602/CEE	Interdiction de certaines hormones et thyrostatiques
Directive 85/649/CEE	Interdiction des hormones (sauf certaines substances)
Directive 88/146/CEE	Interdiction des hormones
Règlement CEE n° 2377/90	Limites maxima de résidus
Directive 96/22/CE	Interdiction des hormones et autres substances

**Tableau II. Principaux textes législatifs européens relatifs aux méthodes de contrôle des résidus et contaminants.**

Document	Objet
Décision 87/410/CEE	Méthodes pour la recherche de résidus d'hormones et de thyrostatiques
Décision 89/610/CEE	Contrôle des résidus
Décision 93/256/CEE	Détection des résidus d'hormones et de thyrostatiques
Décision 93/257/CEE	Méthodes de référence et laboratoires nationaux de référence pour le contrôle des résidus
Décision 2002/657/CEE	Performance des méthodes analytiques et interprétation des résultats

de référence (CRL : *Community Reference Laboratories*) ;

- les laboratoires nationaux de référence (NRL : *National Reference Laboratories*) ;
- les laboratoires de routine.

Tous ces laboratoires, pour être agréés, doivent jouir d'une accréditation basée sur la norme ISO 17025.

### EVOLUTION DES STRATÉGIES D'ANALYSE

En ce qui concerne les hormones, on est passé, dans les années'50-60, des méthodes biologiques (bio-essais sur animaux de laboratoire : test d'Allen et Doisy ; examen histologique de coupes de prostates ou de glandes de Bartholin) aux méthodes d'analyse

physicochimique (tableau III).

A partir des années'80, des méthodes biochimiques ont été appliquées : dosages radioimmunologiques (RIA : *Radio-Immuno Assay*) pour passer ensuite aux dosages immunoenzymatiques (EIA : *Enzyme Immuno Assay* ; ELISA : *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*) dans les années'90.

**Tableau III. Evolution des techniques d'analyse de résidus et de contaminants dans les denrées alimentaires.**

<u>Période</u>	<u>Technique d'analyse</u>			<u>Abréviation (anglophone)</u>
Années'60	Colorimétrie des stéroïdes			
Années'70	Chromatographie sur papier du DES			
1979	Chromatographie haute performance en couche mince		<i>High Performance Thin layer Chromatography</i>	<i>HPTLC</i>
Années'80-90	Chromatographie en phase gazeuse	Détecteur non spécifique	<i>Gas Chromatography</i>	<i>GC</i>
		Détecteur spectromètre de masse		<i>Mass spectrometry</i> <i>GC-MS</i>
Années'90	Chromatographie liquide à haute performance	Détecteur non spécifique	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>	<i>HPLC</i>
		Détecteurs spécifiques (ex. : barre de diodes)		<i>Diode Array Detector</i> <i>LC-DAD</i>
		Détecteur spectromètre de masse		<i>Mass spectrometry</i> <i>LC-MS</i>
Années 2000	Chromatographie liquide			<i>Liquid chromatography</i> <i>LC</i>
		Spectrométrie de masse multiple		<i>Multiple Mass Spectrometry (p.ex. : triple QUAD)</i> <i>MS<sup>n</sup></i>
		Spectrométrie de masse à piège à ions		<i>Ion Trap Detector</i> <i>ITD</i>
		Spectrométrie de masse en temps de vol		<i>Time of Flight Mass Spectrometry</i> <i>TOF-MF</i>
	Chromatographie gazeuse à 2 dimensions			<i>2D Gas Chromatography</i> <i>2D GC ou GCxGC</i>
	Chromatographie liquide à 2 dimensions			<i>2D Liquid Chromatography</i> <i>2D LC ou LCxLC</i>

Actuellement, le besoin se fait sentir de disposer de méthodes multirésidus capables de détecter aussi bien les substances connues que les nouvelles molécules grâce à leurs activités biologiques. Ces méthodes sont basées sur l'utilisation de récepteurs capables de lier une catégorie de substances (hormones : oestrogènes, androgènes... ; antibiotiques : bêta-lactamines, tétracyclines...) ou de cellules, génétiquement modifiées, équipées de récepteurs et de gènes rapporteur (luciférase) comme celles utilisées dans le test pour détecter les dioxines et les substances apparentées.

Ces différentes catégories de méthodes sont le plus souvent associées en vue d'une meilleure efficacité. On distingue généralement deux phases :

- **le dépistage** effectué au moyen d'une méthode d'analyse qui donne une indication forte de la présence d'un résidu dans un échantillon ;
- **la confirmation** qui permet l'identification sans ambiguïté de la substance et son dosage quantitatif avec la justesse et la fidélité requise.

Les principaux tests de dépistage sont repris au tableau IV. Ces tests doivent répondre aux critères suivants :

- sensibilité suffisante ;
- peu coûteux ;
- rapides ;
- préparation de l'échantillon réduite au minimum ;
- applicable à de nombreux échantillons en même temps ;
- multirésidus ;
- pas de faux négatifs (faux conformes) ;
- peu de faux positifs (faux non conformes).

#### Méthodes de confirmation

Parmi les méthodes citées plus haut (tableau III), seules les techniques répondant aux critères repris dans la décision 2002/657/CE peuvent encore être utilisées. En pratique, cette exigence limite quasiment le choix aux méthodes chromatographiques (GC ou LC) couplées à une technique de spectrométrie de masse.

#### Techniques émergentes

Les polymères à empreinte moléculaire (*Molecular Imprinted Polymers* :

**Tableau IV. Principaux tests de dépistage des résidus d'hormones et de médicaments à usage vétérinaire**

<u>Méthodes de détection</u>	<u>Type de méthodes</u>	<u>Substances</u>
Inhibition de la croissance bactérienne	microbiologique	Antibiotiques
Radio-immunoessais ELISA ( <i>Enzyme-Linked Immuno Assay</i> )	immunologique	
Récepteur essais	biochimique	Hormones, $\beta$ -agonistes, antibiotiques ( $\beta$ -lactamines, tétracyclines)
Cellules équipées d'un gène rapporteur	biologique in vitro	Dioxines Hormones anabolisantes
Chromatographie en couche mince*	physicochimique	Sulfonamides, thyrostatiques
Chromatographie en couche mince à haute performance*	physicochimique	Hormones anabolisantes, glucocorticoïdes
Chromatographie couplée à la spectrométrie de masse*	physicochimique	Hormones anabolisantes

Les méthodes signalées par une \* ne répondent pas aux critères requis pour une bonne méthode de dépistage énumérés ci-dessus.

MIP) (Mosbach, 1994 ; Tarbin and Sharman, 2001) : lors de leur synthèse, ils vont prendre l'empreinte d'une molécule et, par la suite, ils pourront fixer, de manière réversible au niveau de cavités spécifiques, ce type de molécules si elles sont présentes dans un extrait d'échantillon. Les applications sont nombreuses dans le domaine de l'analyse des résidus : chromatographie d'affinité ou extraction spécifique sur phase solide pour purifier la substance à analyser avant l'analyse proprement dite, composants de biosenseurs...

Les aptamères (Famulok, 1999) : molécules ayant une affinité et une spécificité élevées pour une cible. Les aptamères étudiés pour leurs propriétés de fixation de résidus (antibiotiques) sont généralement des ARN obtenus par évolution sélective d'oligonucléotides (Muller *et al.*, 1996).

Les biosenseurs : ils reposent sur la

reconnaissance moléculaire d'une substance (ligand) par une macromolécule biologique (anticorps, récepteur) ou un polymère (MIP). En cas de fixation du ligand, une interface adéquate va générer un signal électrique, optique, acoustique ou thermique dont l'intensité sera proportionnelle à la concentration du ligand. Au cours des dernières années, des senseurs optiques (basés sur le principe de la résonance plasmonique de surface (SPR : *Surface Plasmon Resonance*)) ont connu un développement spectaculaire avec de nombreuses applications dans la détection de résidus d'hormones ou d'antibiotiques.

Les signatures biologiques: un animal exposé à une substance active (médicament, contaminant de l'environnement) va réagir vis-à-vis de cette agression extérieure en modifiant par exemple l'activité de certaines enzy-

mes hépatiques (Paris, 2001). Grâce au progrès de la génomique et de la protéomique, on peut maintenant envisager d'analyser l'ensemble des modifications au niveau de l'expression de certains gènes dans des organes prélevés sur des animaux ou encore dans des cellules en culture mises en présence de l'agent toxique. On envisage même dans le futur d'étudier l'impact de résidus ou de contaminants sur la physiologie d'une cellule vivante grâce à la métabolomique (Harland, 2005). Même si certaines techniques paraissent aujourd'hui encore relever de la science fiction, de nombreuses recherches sont en cours dont le but est de fournir aux autorités, aux consommateurs et à l'industrie des solutions à long terme aux problèmes complexes associés à la surveillance de la contamination par des substances chimiques.

## CONCLUSIONS

Il ne fait pas de doute que la présence, à des concentrations plus ou moins élevées, de résidus et de contaminants dans les denrées alimentaires constitue un danger dont il faut estimer les risques pour la santé publique et l'impact sur les consommateurs. Comparés aux risques microbiologiques, les risques

chimiques sont parfois difficiles à estimer vu le délai souvent très long entre l'exposition à de faibles doses de toxiques et l'effet sur la santé ou l'impact sur l'environnement. Par exemple, il n'est pas rare que des cancers se développent 20 ou 30 ans chez des individus qui ont été en contact avec l'agent chimique cancérigène. Il est donc essentiel de supporter la recherche dans le domaine de l'identification et de l'analyse de ces substances qui constituent une première phase dans l'analyse de risque pour la santé humaine ou pour l'environnement. Il est aussi vital d'établir les mécanismes des effets néfastes et d'élaborer des moyens pour minimiser de tels risques.

## RESIDUES AND CONTAMINANTS IN FOOD : 25 YEARS OF PROGRESS IN THEIR ANALYSIS.

### I. EVOLUTION OF THE STRATEGY OF CONTROL.

#### Summary

Evolution of the control of residues and contaminants in food over a period of 25 years is reviewed in its regulatory, technical (analyses performed in labo-

ratories) and strategy aspects. Numerous regulatory texts at the European level, directives, regulations and decisions have been published particularly since the end of the nineties. A dramatic evolution of analytical techniques has been observed going from bioassays on living laboratory animals for controlling hormones to sophisticated physicochemical methods based on mass spectrometry through *in vitro* bioassays on genetically modified cells in culture. The development of research in this sector is essential for a better protection of human and animal health, environment and to fight against frauds ensuring thus the conformity of food to current regulation.

## RÉFÉRENCES

- EUROPEAN COMMISSION, HEALTH & CONSUMER PROTECTION DIRECTORATE-GENERAL Rapid alert system for food and feed (RASFF). [en ligne] (7/01/2006) Adresse URL : [http://europa.eu.int/comm/food/food/rapidalert/index\\_en.htm](http://europa.eu.int/comm/food/food/rapidalert/index_en.htm) Consulté le 7/01/2006
- FAMULOK M. Oligonucleotide aptamers that recognize small molecules. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 1999, **9**, 324-329.
- HARLAND J.I. The new technologies. In : Harland J.I., Nutrition and genetics : mapping individual health. International Life Science Institute (ILSI) Europe : Brussels, 2005, 10-14.
- MULLER B.K., JAY D.G., BONHOEFFER F. Chromophore-assisted laser inactivation of a repulsive axonal guidance molecule. *Curr. Biol.*, 1996, **6**, 1497-1502.
- PARIS A. Profils suspects sous surveillance. *La Recherche*, 2001, **339**, 74-77.
- TARBIN J.A., SHARMAN, M. Development of molecularly imprinted phase for the selective retention of stilbene-type estrogenic compounds. *Anal. Chim. Acta*, 2001, **433**, 71-79
- VERBEKE R. Sensitive multi-residue method for detection of anabolics in urine and in tissues of slaughtered animals. *J. Chromatogr.*, 1979, **177**, 69-84.