

4^e trimestre 2000

N°35

LA LETTRE DE CECALAIT

CECALAIT INRA SRTAL BP 89 39801 Poligny TEL : 03.84.73.63.20 TELECOPIE : 03.84.73.63.29

E-mail : bapt@poligny.inra.fr ou trossat@poligny.inra.fr

Rédaction achevée le 12 décembre 2000

Equipe rédactionnelle : A. BAPTISTE; O. LERAY

Relecture par : M-L DE BUYSER, D. FRAISSE, H. DAMOUR, P. ROLLIER, Ph. TROSSAT et les auteurs

SOMMAIRE

Le problème des dioxines

Nouveautés dans la réglementation

Validations AFNOR

Brèves...

Résultats du programme européen sur les staphylocoques

Normes et projets de normes parus récemment

Du côté de la biblio...

Rendez-vous

La filière en deuil

Le problème des dioxines

(Résumé de l'intervention de M FRAISSE -CARSO* -
lors de l'Assemblée générale 2000 de CECALAIT)

Les dioxines regroupent deux grandes familles de molécules : les dibenzo-p-dioxines polychlorées (PCDD), comprenant 75 molécules, les dibenzofuranes polychlorés (PCDF) de structure chimique voisine, comprenant 135 molécules. 7 PCDD, dont la dioxine de Seveso et 10 PCDF partagent une structure planaire, rigide et très stable : ce sont les plus toxiques. Elles agiraient directement au niveau du noyau cellulaire et leurs effets dépendent de la dose, de l'espèce et de la sensibilité des sujets. Aux doses élevées, on a observé des troubles hépatiques, neurologiques et dermatologiques graves ainsi que des effets tératogènes.

Les dioxines sont produites principalement lors de la combustion de produits organiques, en présence de chlore ou lors du chauffage intense des PCB (polychlorures biphenylés), très utilisés dans l'industrie. Transportées par les poussières en suspension dans l'air ou par les eaux, elles arrivent dans la chaîne alimentaire et se concentrent dans les tissus adipeux animaux ou humains. Leur toxicité se mesure en ITEQ, une échelle établie, à partir de la toxicité de la dioxine de Seveso. L'exposition tolérable est alors calculée à partir de cette échelle, en considérant toutes les sources possibles de dioxines dans l'environnement. L'OMS a fixé la dose maximale tolérable à 4 pg/j/kg de poids corporel et recommande une valeur guide de 1pg/j/kg. Leur dosage nécessite des méthodes extrêmement sophistiquées, compte tenu des concentrations recherchées. Il fait appel à la chromatographie en phase gazeuse à haute résolution couplée à la spectrométrie de masse, après dilution isotopique.

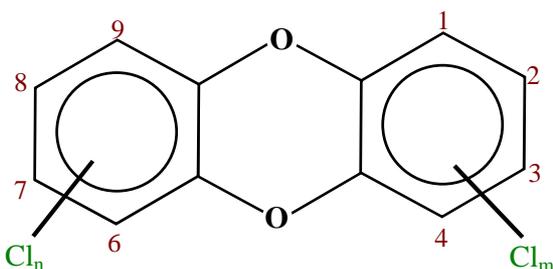
Révélee au grand jour lors de la mise en évidence en 1957 des effets tératogènes liés à la fabrication d'un pesticide chloré, puis lors d'accidents industriels, notamment celui de Seveso, la question des dioxines apparaît régulièrement dans l'actualité. L'affaire des poulets contaminés en Belgique en 1999 a, de plus, attiré l'attention sur leur impact dans la chaîne alimentaire. D'où l'intérêt d'une mise au point sur cette question pour rappeler la définition des dioxines, leurs sources et leur toxicité, pour préciser quelle est la contamination des produits alimentaires, pour s'informer des possibilités de dosage.

Structure et propriétés chimiques

Les dioxines ou dibenzo-p-dioxines polychlorées ou PCDD constituent une famille de molécules dont la structure chimique (cf figure 1 ci-dessous) est basée sur un noyau dibenzodioxine, c'est à dire 2 noyaux benzeniques reliés par une dioxane centrale. Ceux-ci comportent 8 sites où les atomes d'hydrogène sont susceptibles d'être substitués par des atomes de chlore. L'utilisation de toutes les différentes possibilités de substitution aboutit à une famille de 75 congénères.

Fig 1 : schéma d'une molécule de dibenzo-p-dioxine polychlorée ou PCDD

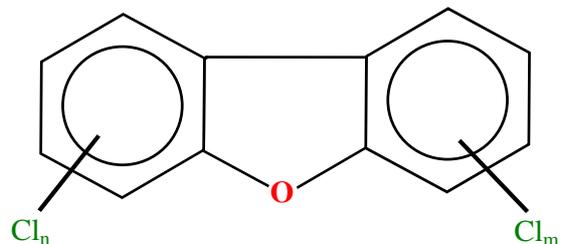
Fig 1 : scheme of a PCDD molecule



En outre, dans l'usage courant, le terme générique « dioxines » désigne également les furanes ou dibenzofuranes polychlorés ou PCDF, de structure chimique voisine (cf figure 2 ci-dessous). Comme pour les PCDD, le jeu des différentes possibilités de substitution aboutit à une famille de 135 congénères.

Fig 2 : schéma d'une molécule de dibenzofurane polychloré ou PCDF

Fig 2 : scheme of a PCDF molecule



Parmi ces 210 (75 + 135) molécules, celles qui comprennent au moins 4 atomes de chlore substituant les sites 2-3-7-8 acquièrent ainsi des propriétés particulières. En effet, leur structure est planaire et d'une grande rigidité ; l'encombrement stérique autour de chaque atome de chlore les rend d'accès difficile aussi bien pour les réactions chimiques que biochimiques. Elles sont donc très faiblement biodégradables et tendent à s'accumuler dans les organismes vivants. Cette conformation est commune à 10 molécules de furanes et 7 de dioxines - dont la « dioxine de Seveso », 2,3,7,8 tétrachloro-dibenzodioxine ou 2,3,7,8 TCDD - qui sont appelées « les toxiques » (*dirty dioxins*).

Ces molécules sont peu solubles dans l'eau - avec une solubilité décroissant selon le nombre d'atomes de chlore -, peu volatiles et chimiquement et thermiquement très stables. Elles sont, en revanche, solubles dans les solvants organiques et les graisses et sensibles au rayonnement ultra-violet.

Origine et cycle des dioxines dans l'environnement

Les dioxines se forment lors de la combustion, à relativement haute température (plus de 300°C) de produits organiques en présence de chlore. Elles proviennent donc pour partie d'éruptions volcaniques, de feux de forêts, de la combustion du charbon, mais surtout de l'incinération des déchets ménagers. Ce sont, en outre, des produits secondaires (*byproducts*) liés à la fabrication industrielle de pesticides, de bactéricides, au blanchiment de la pâte à papier. Enfin, elles peuvent être produites accidentellement lors de l'emballage de réactions chimiques utilisant des chlorophénols (accident de Seveso) ou en cas de chauffage intense de polychlorures biphényles (PCB), très utilisés dans l'industrie pour leurs propriétés diélectriques, qui dégagent alors des furanes.

Les rejets de dioxines touchent l'air, le sol et l'eau. Dans l'air, leur demi-vie est de quelques jours, mais les poussières en suspension peuvent, en se redéposant, contaminer indirectement le sol ou les eaux. Au sol, la demi-vie est de 1 à 3 ans en surface, mais de plus de 10 ans en profondeur. Les eaux peuvent, en outre, se contaminer par lixiviation. En ce qui concerne les organismes vivants, aucune absorption et bioaccumulation n'a pu être observée dans les plantes terrestres, quel que soit leur mode de contamination, contrairement aux algues. Les animaux, en revanche, et l'homme absorbent les dioxines par leur alimentation et les accumulent dans les tissus adipeux.

L'évaluation du degré d'exposition de l'homme aux dioxines se fait :

- soit à partir de l'estimation de la quantité de dioxines susceptible d'être produite par toutes les sources citées ci-dessus,
- soit, considérant que la voie alimentaire est la source d'exposition majeure, en se basant sur les données de consommation et les données de contamination des différentes catégories d'aliments entrant dans le régime alimentaire d'une population donnée (*c'est le cas des récentes études françaises; cf bibliographie*).

Toxicité et exposition de l'homme

Tous les modes d'action des dioxines ne sont pas connus. Un des schémas, bien établi cependant, montre les molécules pénétrant dans les cellules et se fixant à une protéine qui joue le rôle de récepteur aux arylhydrocarbures (Ah). Le complexe ainsi formé pourrait pénétrer dans le noyau, se recombinaire à une nouvelle protéine et cet ensemble viendrait ensuite se fixer sur un site favorable sur l'ADN, aboutissant à une altération de l'expression de certains gènes.

Les études toxicologiques menées en laboratoire sur des animaux montrent une faible toxicité aiguë. En revanche, une exposition chronique conduit à des dérèglements neurologiques et hépatiques, ainsi qu'à des effets cancérogènes avec certaines molécules, notamment la 2,3,7,8 TCDD. La sévérité des troubles dépend cependant étroitement :

- de la sensibilité de l'espèce : les cobayes développent ainsi des cancers du foie à des doses relativement faibles, qui n'affectent pas les rats,

- du sexe : même au sein d'une espèce peu sensible comme le rat, les femelles développent des cancers du foie à des doses n'affectant pas les mâles.

Dans l'espèce humaine, l'exposition à ces molécules provoque également des dérèglements biologiques et biochimiques, mais leur signification clinique n'est pas encore connue, aux doses faibles habituellement ingérées. A des doses sévères, observées, par exemple, lors de l'exposition à l'agent orange défoliant pendant la guerre du Vietnam ou lors d'accidents industriels comme à Yusho Oil au Japon en 1968 ou comme à Seveso en 1976, les victimes ont souffert de maladies de peau (chloracné) et de différents troubles neurologiques : maux de tête, vertiges, oedèmes avec atteintes nerveuses des membres inférieurs. Des troubles de la reproduction (nouveaux-nés de faible poids) et des effets tératogènes, en particulier lors des accidents liés à la fabrication du 2,4,5-T en 1957, ont également été observés.

L'expression de la toxicité et le calcul de la dose journalière admissible doivent tenir compte de tous ces éléments. Ils doivent également considérer le fait que l'exposition aux dioxines est le fait d'un mélange complexe de plusieurs molécules. C'est pourquoi, la toxicité est exprimée en unités ITEQ (International Toxic Equivalency Quantity) qui se réfèrent à une échelle de Facteurs de Toxi Equivalence (TEF), « classant » les composants évalués par rapport à la toxicité de la 2,3,7,8 TCDD, laquelle a un TEF de 1. La toxi équivalence (ITEQ) est alors calculée selon la formule suivante :

$$\text{ITEQ} = \sum \text{TEF}_i \times C_i$$

où C_i est la quantité ou la concentration du congénère i .

Les TEF des 7 molécules de dioxines « toxiques » varient ainsi de 1 pour la 2,3,7,8 TCDD, mais aussi pour la 1,2,3,7,8-PeCDD** (pentachlorodioxine) à 0,0001 pour la 1,2,3,4,6,7,8,9 OCDD (octachlorodioxine). Pour les 10 molécules de furanes « toxiques », les TEF varient de 0,5 à 0,0001.

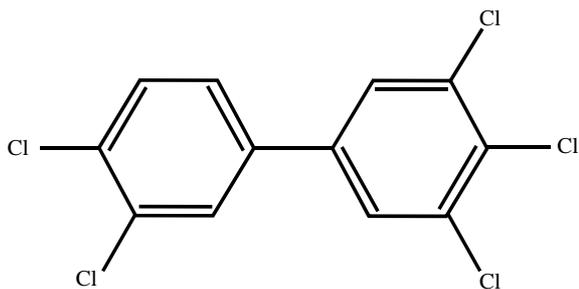
** depuis la nomenclature de l'OMS de 1997.

Dose journalière admissible

L'échelle des TEFs ainsi que la liste des composés à considérer pour le calcul de l'ITEQ sont revues périodiquement à la lumière des nouvelles connaissances et données disponibles. Ainsi les nomenclatures établies par l'EPA en 1987 ou par l'OTAN en 1989 (cette dernière continuant à être largement utilisée depuis, y compris jusque dans les études récentes de l'AFSSA ou de l'InVs) ne prenaient en compte que les PCDD et les PCDF et le TEF de la 1,2,3,7,8 PeCDD n'y était, par exemple, que de 0,5. Mais depuis 1997, l'OMS, puis l'EPA recommandent d'élargir la palette des composés considérés à certains PCBs, dits « *dioxin like* » (cf fig 3, à titre d'exemple). Il s'agit d'un groupe de 14 molécules (sur les 209 PCBs existants) qui :

- d'un point de vue chimique, présentent une structure coplanaire stable, proche des PCDD ou PCDF et sont substituées en mono ortho, di ortho ou non ortho,
- d'un point de vue biologique, se lient également aux récepteurs cellulaires Ah, induisent des effets biologiques voisins des dioxines et sont bioaccumulés.

Fig 3 : schéma de la molécule de PCB 126
Fig 3 : scheme of the PCB 126 molecule



D'après l'échelle de toxicité établie par l'OMS en 1997, leurs TEF varient de 0,1 pour le PCB 126 à 0,00001 pour les PCB 167 et 180. Ces valeurs peuvent, de prime abord sembler négligeables par rapport à celles des PCDD, mais comme ces PCBs sont beaucoup plus abondants dans l'environnement que les PCDD, leur impact sur l'ITEQ ne sera pas négligeable^{***}. Cette échelle va d'ailleurs continuer à évoluer, puisque l'OMS recommande d'ores et déjà d'inclure en plus, dans la prochaine révision (en 2003) les dérivés bromés des dibenzodioxines.

^{***} Dans ce cadre, la formule de calcul de l'ITEQ ci-dessus doit bien sûr être complétée par la somme des $PCB_i \times TEF_i$.

A l'heure actuelle, ces calculs aboutissent à une recommandation par l'OMS d'une dose journalière admissible de 1 à 4 pg/kg de poids corporel/j, cette dose correspondant à une exposition chronique, c'est à dire à un apport journalier pendant toute une vie, calculé pour un adulte de 70 kg.

Dosage des dioxines

► UNE METHODE ANALYTIQUE SOPHISTIQUEE

Compte tenu des valeurs données ci-dessus, le dosage des dioxines revient à la quantification d'ultra-traces, de l'ordre du pg, voire du 1/2 pg par g de matière. Plusieurs méthodes analytiques revendiquent une telle sensibilité, mais celle qui est reconnue comme la plus performante, à ce jour, fait appel au couplage de la chromatographie gazeuse et de la spectrométrie de masse à haute résolution, en utilisant la dilution isotopique par des homologues marqués au ¹³C pour la quantification.

La dilution isotopique consiste à ajouter une masse connue d'un produit marqué, à une masse inconnue, à doser, du même produit natif. Le rapport entre les congénères natifs et leurs homologues marqués permet de quantifier la masse inconnue. Cette technique est recommandée lorsque les étapes d'extraction et de purification de l'échantillon, puis de l'extrait brut risquent de conduire à des pertes importantes du produit à doser. En effet, le produit marqué étant incorporé dans la matrice à un stade précoce de la manipulation, il subira les mêmes étapes et les mêmes pertes que le produit natif.

Les échantillons à doser, qui doivent être représentatifs, reçoivent, après broyage, tamisage et/ou homogénéisation éventuelles, un apport des 17 congénères marqués au ¹³C. Pour les produits alimentaires, dont les produits laitiers, qui contiennent une part importante de matière grasse, ces molécules marquées

ne seront introduites que dans la matière grasse des échantillons, après son extraction.

Les contaminants de la matière grasse doivent ensuite en être séparés et être concentrés :

- soit, dans la méthode de référence du CARSO, d'origine hollandaise, par passage sur colonne de charbon actif; une méthode très longue, mais qui, en permettant de traiter plusieurs dizaines de grammes de matière grasse, permet de détecter des concentrations très faibles de dioxines,
- soit, plus rapidement, selon différentes étapes de chromatographie sur colonne.

Les contaminants qui ne sont pas recherchés dans la suite de l'analyse, et notamment les PCB non « dioxin-like » doivent ensuite être éliminés par différentes étapes de chromatographie préparative sur colonne. L'extrait ainsi obtenu, qui ne devrait plus contenir, en principe que les PCDD, PCDF et quelques PCB « dioxin-like », sera ensuite analysé par couplage de la chromatographie gazeuse haute résolution et de la spectrométrie de masse haute résolution.

Les résultats obtenus se présentent sous forme de profils chromatographiques des différents congénères présents dans l'échantillon. Ces profils sont obtenus à la fois pour les molécules marquées et pour les molécules natives. Cela permet donc de déterminer par calcul, la masse initiale de chacune d'entre elles, ainsi que la quantité totale de dioxines, quelles que soient les pertes subies. Il est souhaitable cependant que celles-ci ne dépassent pas 50%, ce que l'introduction d'un 18^e étalon marqué, juste avant le passage en chromatographie gazeuse, permet de vérifier. Il est indispensable, en outre, que l'ensemble de l'analyse ait été effectuée dans des conditions de laboratoire très rigoureuses, permettant d'éliminer tout risque de contamination accidentelle d'un échantillon ou d'un réactif.

Chaque congénère PCDD ou PCDF quantifié dans la matrice étudiée, est ensuite multiplié par son TEF correspondant, ce qui conduit à l'ITEQ du produit étudié. L'étude des profils est très intéressante : on a ainsi pu constater que le lait de vache, le lait maternel ou les tissus adipeux humains présentent des profils comparables, avec accumulation des mêmes congénères, mais à des concentrations différentes.

Il existe d'autres méthodes de dosage, notamment l'utilisation de la spectrométrie de masse basse résolution, mais elles n'atteignent pas la même sensibilité. D'autres tests plus rapides, sont toujours en cours d'évaluation. Une stratégie consistant à rechercher le niveau de certains PCB, considérés comme marqueurs de la pollution aux dioxines a également été préconisée. Or l'analyse des PCB est, sauf pour les PCB *dioxin-like*, globalement plus rapide, plus facile (chromatographie en phase gazeuse), moins chère et pratiquée par un peu plus de laboratoires que l'analyse des dioxines. Mais en fait, cette approche n'est valable que lorsque la contamination en PCDD-PCDF provient de PCB, source de furanes –ce qui était le cas lors de la crise belge -. Dans les autres cas, aucun lien entre teneurs en PCB et teneur en dioxines n'a pu être mis en évidence.

➤ ACCREDITATION, METHODE DE REFERENCE ?

La seule norme qui existe actuellement au niveau européen concerne le dosage des dioxines dans les émissions et a servi de base au programme d'accréditation (n° 97) du COFRAC. Ce programme ne couvre pas cependant les demandes d'accréditation concernant les matrices contenant des corps gras, dont le lait. Celles-ci font l'objet d'un traitement spécifique et très peu de laboratoires sont accrédités pour l'heure. Le CARSO a, dans ce cadre, validé sa méthode; applicable à ce type de matrice, élaborée à partir de la littérature scientifique internationale. Pour tout développement de méthode, il recommande la lecture de la méthode EPA 1613, qui sert d'ailleurs de base à la préparation d'une norme ISO sur la question. Dans l'attente, lors d'une analyse de dioxines, des précisions sur le protocole expérimental et la technique utilisés sont indispensables.

En conclusion, le dosage des dioxines fait appel à des méthodes analytiques très sophistiquées, étant donné les teneurs faibles –ultratraces- recherchées. Une tendance à la normalisation des méthodes se dessine et correspondrait aux attentes des demandeurs d'analyse, notamment des professionnels de l'industrie agro-alimentaire. En dehors des accidents, la voie alimentaire constitue en effet la source d'exposition majeure -90%- de la population, notamment par le biais des aliments riches en matière grasse.

En France, trois rapports récemment publiés permettent d'évaluer le niveau d'exposition aux dioxines et furanes (PCDD et PCDF), par voie alimentaire, de la population française en général, ainsi que dans différentes classes d'individus présentant des régimes alimentaires spécifiques (enfants de moins de 2 ans, de 2 à 9 ans et adolescents de 10 à 14 ans). D'après l'étude AFSSA-CSHPF, la valeur d'exposition moyenne de la population française aux dioxines et aux furanes est de 1,3 pg/kg de poids corporel/j. Dans le rapport d'expertise collectif de l'INSERM, qui prend également en compte les PCB *dioxin like*, elle serait de 2 pg/kg poids corporel/j. Cette valeur d'exposition moyenne peut être transitoirement plus élevée pour des catégories aux régimes alimentaires particuliers, notamment les jeunes enfants. Cependant, ramenée aux doses absorbées durant toute une vie, elle reste, comme celle de la population générale dans les limites recommandées par l'OMS.

Abréviations

ADEME : Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie
ADN : acide désoxy-ribo-nucléique
AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des aliments
Ah : (récepteur) Arylhydrocarbure
COFRAC : Comité Français d'Accréditation
CSHPF : Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France
EPA : Environmental Protection Agency
INSERM : Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale
InVS : Institut de Veille Sanitaire
ISO : International Standardization Organization
ITEQ : International Toxic Equivalency Quantity
OCDD : octachlorodioxine
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
OTAN : Organisation du Traité de l'Atlantique Nord
PCB : polychlorures biphénylés
PCDD : dibenzo-p-dioxines polychlorées
PCDF : dibenzofuranes polychlorés
PeCDD : pentachlorodioxine
pg : picogramme = 10⁻¹²g
TCDD : tétrachloro-dibenzodioxine
TEF : Facteur de Toxi Equivalence

Bibliographie

- ◆ **AFSSA - CSHPF.** Dioxines : données de contamination et d'exposition de la population française. Rapport : Juin 2000, 45 pages (consultable sur <http://www.afssa.fr/ftp/basedoc/Dioxines2bis.pdf>)
- ◆ **CERIN** (Centre de recherche et d'Information Nutritionnelles). Dioxines et furanes : doit-on s'inquiéter ? Nutri-doc, octobre 1999, n°21
- ◆ Dioxines. La Lettre ARITT, septembre 1999, n° 13, 5 pages
- ◆ EPA Dioxin Reassessment (Draft Documents, September 2000) : <http://www.epa.gov>
- ◆ **European Commission. Health & Consumer Protection Directorate General.** Reports on task for Scientific Cooperation. Assessment of dietary intake of dioxins and related PCBs by the population of EU members States. June 2000, 115 pages. (consultable sur http://europa.eu.int/comm/dgs/health_consumer/library/pub)
- ◆ **INSERM.** Dioxines dans l'environnement : quels risques pour la santé ? Rapport d'expertise collective de l'INSERM, octobre 2000. Editions INSERM. (consultable sur <http://www.inserm.fr>)
- ◆ **InVs / ADEME.** Etude sur les dioxines et les furanes dans le lait maternel en France. Rapport : Juin 2000, 173 pages (consultable sur <http://www.invs.sante.fr>)

* *CARSO : Centre d'Analyses de Traces, 321 avenue Jean Jaurès 69362 LYON CEDEX 07*

Nouveautés dans la réglementation

FRANCE

Arrêté du 20 juillet 2000, fixant la liste des laboratoires ayant obtenu un certificat de qualification technique pour la mesure de la **radioactivité** de l'environnement et des denrées destinées à la consommation (JO France du 19/8/2000)

Arrêté du 21 juillet 2000, portant agrément de laboratoires pour procéder à l'analyse et aux essais pour la répression

des fraudes (JO France du 4/8/2000). Ce texte donne, entre autres, une liste de 29 laboratoires agréés pour les analyses, dans des domaines de compétence précisés, dans les produits alimentaires.

Arrêté du 31 juillet 2000, relatif **au retrait de la consommation humaine des denrées d'origine animale contaminée par des résidus de pesticides**(JO France du

1/9/2000). Ce texte est la transposition en droit français de la directive 2000/24 du 28/4/2000.

Arrêté du 28 juillet 2000, définissant les modalités d'application du décret n° 97-1319 du 30 décembre 1997, relatif aux modalités de paiement du lait de vache en fonction de sa composition et de sa qualité (JO France du 12/10/2000). Ce texte abroge les arrêtés du 16/12/1970 (agrément des laboratoires effectuant les prélèvements et analyses en vue du paiement du lait de vache) et du 5/7/1994 (relatif à la CST). Les nouvelles conditions d'agrément des laboratoires cités ci-dessus sont décrites dans son annexe III, avec notamment des obligations d'assurance qualité. L'annexe II redéfinit la composition, la qualification et le fonctionnement de la CST. Ce texte abroge, en outre, l'arrêté du 2/5/1985 (modalités techniques des prélèvements et analyses des échantillons de lait livrés par les producteurs aux fins de la détermination de la composition et de la qualité) dans ses dispositions relatives au lait de vache. Ces dernières ont été modifiées de façon substantielle par les nouvelles modalités, décrites en annexe I, de prélèvement des échantillons; d'autorisation de prélèvement sur des laits de 72h, de conservation et transport des échantillons, d'expression et notification des résultats.

Arrêté du 13 juillet 2000, modifiant l'arrêté du 2/10/1997 modifié relatif aux additifs pouvant être employés dans la fabrication des denrées destinées à l'alimentation humaine (JO France du 18/8/2000). Ce texte est la transposition en droit français de la directive 99/75 du 22/7/1999.

Arrêté du 20 septembre 2000, relatif aux aliments diététiques destinés à des fins médicales spéciales (JO France du 13/10/2000). Ce texte donne notamment la composition en vitamines et minéraux des aliments diététiques destinés aux nourrissons.

Les Journaux Officiels Français sont consultables sur Minitel 3616 JOEL ou sur Internet <http://www.legifrance.gouv.fr/>

EUROPE COMMUNAUTAIRE

Directive 2000/51/CE de la Commission du 26/7/2000 modifiant la directive 95/31 établissant des critères de pureté spécifique pour les édulcorants pouvant être utilisés dans les denrées alimentaires (JOCE L 198 du 4/8/2000). Les fiches du mannitol et du sirop de maltitol ont été modifiées pour tenir compte des spécifications du Codex Alimentarius.

Directive 2000/58/CE de la Commission du 22/9/2000 modifiant les annexes des directives.....86/363/CEE concernant la fixation de teneurs maximales pour les résidus de pesticides sur et dansles denrées alimentaires d'origine animale.... (JOCE L 244 du 29/9/2000). Ce texte complète la liste des teneurs maximales de résidus de pesticides autorisées dans le lait cru avec les pesticides suivants : krésoxym méthyl : 0,02 mg/kg, teneur maximale provisoire.

➤ Comme à l'accoutumée, le règlement n° 2377/90 du Conseil établissant une procédure communautaire pour la fixation des **limites maximales de résidus de médicaments vétérinaires** dans les aliments

d'origine animale a vu paraître un certain nombre de textes modificatifs. Ainsi :

Les annexes I, II et III ont été modifiées par les règlements **2338/2000** et **2391/2000** des 20 et 27/10/2000 (JOCE L 269 du 21/10/2000 et L 276 du 28/10/2000). Ces textes rajoutent quelques substances organiques et quelques substances d'origine végétale à la liste des substances non soumises à une limite maximale de résidus. Ils rajoutent également des LMR dans le lait, pour le médicament β 2-sympathomimétique clenbutérol : 0,05 μ g/kg, ainsi que pour un certain nombre d'antibiotiques : fluméquine : 50 μ g/kg, marbofloxacine : 75 μ g/kg; érythromycine (sauf pour les animaux produisant du lait destiné à la consommation humaine) : 40 μ g/kg, pirlimycine : 100 μ g/kg, tilmicosine : 50 μ g/kg. Ils stipulent enfin une LMR provisoire de 50 μ g/kg pour l'antibiotique colistine.

Les annexes I et III ont été modifiées par le règlement **1960/2000 du 15/9/2000** (JOCE L 234 du 16/9/2000). Ce texte rajoute une LMR dans le lait, pour l'antibiotique spectinomycine : 200 μ g/kg. Il stipule également des LMR provisoires pour un certain nombre d'antibiotiques : streptomycine et dihydrostreptomycine : 200 μ g/kg, gentamicine : 200 μ g/kg, néomycine : 500 μ g/kg.

L'annexe I a été modifiée par le règlement **2535/2000 du 17/11/2000** (JOCE L 291 du 18/11/2000). Ce texte fixe une LMR de 6 μ g/kg de lait pour le corticoïde prednisolone.

➤ à signaler également la parution

Directive 2000/63/CE de la Commission du 5/10/2000 modifiant la directive 96/77/CE établissant des **critères de pureté spécifiques pour les additifs alimentaires** autres que les colorants et les édulcorants.

Les Journaux Officiels de l'Union Européenne des 45 derniers jours sont consultables sur <http://europa.eu.int/eur-lex>

Les textes plus anciens peuvent être commandés sur <http://www.eudor.com>



à suivre ...

Comme nous l'avons signalé dans la Lettre de CECALAIT n°34, la Commission souhaite faire évoluer les règles d'hygiène en matière de sécurité alimentaire. Depuis, sont parus les actes préparatoires communautaires concernant les révisions des directives concernées ; le tout étant prévu pour application en 2004.

- Proposition de règlement du Parlement européen et du Conseil relative à l'hygiène des denrées alimentaires http://europa.eu.int/eur-lex/fr/com/dat/2000/fr_500PC0438_01.html

- Proposition de règlement du Parlement européen et du Conseil fixant les règles spécifiques d'hygiène applicables aux denrées alimentaires d'origine animale http://europa.eu.int/eur-lex/fr/com/dat/2000/fr_500PC0438_02.html

- Proposition de règlement du Parlement européen et du Conseil fixant les modalités d'organisation des contrôles officiels concernant les produits d'origine animale destinés à

la consommation humaine http://europa.eu.int/eur-lex/fr/com/dat/2000/fr_500PC0438_03.html

• Proposition de règlement du Conseil fixant les règles de police sanitaire régissant la production, la mise sur le marché et l'importation des produits d'origine animale destinés à la consommation humaine http://europa.eu.int/eur-lex/fr/com/dat/2000/fr_500PC0438_04.html

• Proposition de directive du Parlement européen et du Conseil abrogeant certaines directives relatives à l'hygiène des denrées alimentaires et aux règles sanitaires régissant la production et la mise sur le marché de certains produits d'origine animale destinés à la consommation humaine, et modifiant les directives 89/662/CEE et 91/67/CEE http://europa.eu.int/eur-lex/fr/com/dat/2000/fr_500PC0438_05.html

Validations AFNOR

Le département Certifications de l'AFNOR nous a fourni sa dernière liste de méthodes alternatives d'analyses validées, en date du 27/9/2000.

Deux nouvelles méthodes ont été validées au cours des derniers mois. Il s'agit de

↳ **SPRINT *Salmonella***, de la société Oxoid, validé le 5/7/2000 (*n° d'attestation : UNI 03/3 -07/00*), un kit de pré-enrichissement et d'enrichissement en *Salmonella*, applicable à tous les produits laitiers.

Dans la méthode de référence (NF EN 12824) le protocole expérimental se décompose en quatre phases successives :

- pré-enrichissement en eau peptonnée tamponnée,
- enrichissement sélectif, entre autres, en milieu Rappaport-Vassiliadis,
- isolement et identification en milieux sélectifs solides,
- confirmation.

Les deux premières étapes demandent respectivement 16 à 20h, et 24 à 48h. Ce kit, basé sur les mêmes milieux permet de pratiquer ces mêmes étapes en 24h, sans manipulation supplémentaire. Ce gain de temps se répercute sur l'ensemble de la méthode, permettant ainsi d'obtenir des résultats négatifs en 4 jours contre 5 à 7 pour la méthode de référence, des résultats positifs présomptifs en 3 à 4 jours contre 4 à 6 jours et des résultats positifs en 4 à 5 jours contre 6 à 8 jours. De plus, la spécificité et la sensibilité de la méthode sont bonnes, de même

que ses performances de fidélité et de justesse, déterminée par rapport à la méthode de référence.

↳ **ALOA / L. Monodisk**, de la société AES, validé le 27/9/2000 (*n° d'attestation : AES 10/3 -09/00*), un milieu chromogénique pour la détection rapide de *Listeria monocytogenes*, applicable à tous les produits d'alimentation humaine.

Le texte de cette dernière attestation de validation est encore sous presse. Nous vous fournirons des informations plus détaillées dès sa parution.

↳ En revanche, nous avons reçu le texte correspondant à la validation de **EIAFOSS ELISA kit *Salmonella***, de la société Foss, signalée dans la Lettre de CECALAIT n° 34. Cet analyseur regroupe les techniques d'immunoséparation et ELISA. Pratiquée après un enrichissement préalable et un court post-enrichissement, la méthode permet d'obtenir un résultat négatif en une journée –pour les produits d'alimentation humaine- contre 5 à 7 jours pour la méthode de référence. Pour les résultats positifs, en revanche, il faut compter 5 à 6 jours – contre 6 à 8 jours-, puisqu'une confirmation selon les méthodes biochimiques et sérologiques classiques est nécessaire. Avec très peu de réactions croisées, la spécificité de la méthode apparaît satisfaisante et sa sensibilité est meilleure que la méthode de référence. En outre, ses performances de fidélité et de justesse, déterminée par rapport à la méthode de référence, sont bonnes.

Brèves

Du 17 au 21 juillet 2000, à Rome, la FAO et l'OMS ont organisé conjointement et pour la première fois une consultation d'experts sur l'évaluation du risque microbiologique dans les aliments.

Des informations complémentaires, un compte rendu et des documents techniques préliminaires sur les risques liés à *Listeria* et *Salmonella* sont parus depuis. Ils sont consultables aux adresses suivantes

- <http://www.fao.org/waicent/faoinfo/economic/ESN/pagerisk/riskpage.htm>
- <http://www.fao.org/waicent/faoinfo/economic/ESN/pagerisk/report.pdf>
- <http://www.fao.org/waicent/faoinfo/economic/ESN/pagerisk/techdocs.htm>

FAO : Food and Agricultural Organization
OMS : Organisation Mondiale de la Santé

Résultats du programme européen sur les staphylocoques

(Résumé de l'intervention de Mme DE BUYSER -AFSSA-

lors de l'Assemblée générale 2000 de CECALAIT)

Les méthodes NF EN ISO 6888-1 & -2 de dénombrement des staphylocoques à coagulase positive dans les aliments ont été évaluées, dans le cadre d'un programme européen destiné à établir, au moyen d'études collaboratives, les performances de fidélité des méthodes ISO de détection et/ou dénombrement de microorganismes pathogènes dans les aliments. Ces méthodes utilisent respectivement, le milieu gélosé de Baird-Parker (BP) et le milieu gélosé au plasma de lapin et au fibrinogène (RPFA). Elles sont apparues globalement satisfaisantes et il est recommandé dorénavant de leur accorder le même statut. Les valeurs moyennes de fidélité obtenues pour le fromage sont :

- $r(\log) = 0,33$ et $R(\log) = 0,55$ pour le milieu BP
- $r(\log) = 0,18$ et $R(\log) = 0,31$ pour le milieu RPFA,

et seront prochainement incluses dans la norme par le biais d'un amendement.

Pour adopter une méthode normalisée en tant que norme Européenne, le CEN (Comité Européen de Normalisation) exige des données sur sa fidélité (répétabilité et reproductibilité) qui doivent avoir été établies par une étude collaborative, conformément à la norme ISO 5725. Fin 1996, la Commission Européenne a lancé un projet sur quatre ans, destiné à évaluer six méthodes microbiologiques horizontales ISO, portant sur la détection et / ou le dénombrement dans les aliments des microorganismes pathogènes suivants : *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus* à coagulase positive, *Clostridium perfringens*, *Salmonella*.

Par le passé, nous avons rendu compte des résultats obtenus à l'issue des études sur :

- le dénombrement de *Bacillus cereus* dans les aliments par la norme ISO 7932, 1993 (cf Lettre de CECALAIT n° 26),
- la détection et le dénombrement de *Listeria monocytogenes* par les méthodes ISO 11290-1 et ISO 11290-2 (cf Lettre de CECALAIT n° 30).

Depuis, d'autres études sont arrivées à leur terme, notamment celle concernant le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive.

Dans ce projet de grande ampleur, impliquant une vingtaine de laboratoires internationaux, les coordinateur et partenaires du programme restent :

- coordinateur de l'ensemble du projet : AFSSA (Mme LAHELLEC)
- partenaires : le RIVM aux Pays-Bas et le MAFF-CSL au Royaume Uni

Parmi les sous-contractants de ce programme, CECALAIT a assuré la préparation, la mise au point, la définition des paramètres de conservation et l'expédition des échantillons de fromage.

Rappelons que les staphylocoques à coagulase positive, c'est à dire principalement *Staphylococcus aureus*, mais aussi quelques autres espèces, sont des germes pathogènes, capables de produire des entérotoxines, responsables de toxi-infections alimentaires. D'après la réglementation (Arrêté du 30/3/1994), leur teneur, lors de la mise sur le marché, ne doit pas dépasser la

valeur « m » de 100/ml, dans les laits crus de vache destinés à la consommation en l'état ; dans les autres produits laitiers, elle doit être inférieure à 10, 100 ou 1000/ml ou /g selon le type de produit concerné.

La méthode horizontale de référence pour les dénombrer est la méthode NF EN ISO 6888 de 1999, qui se décompose, en fait en deux parties. La partie 1 utilise le milieu de Baird-Parker, puis un test de confirmation par la recherche d'une coagulase ; la partie 2 utilise le même milieu de base que la partie 1, supplémenté par une solution au plasma de lapin et au fibrinogène (RPFA).

L'objectif de l'étude était donc de valider chacune de ces méthodes et de déterminer leurs valeurs de fidélité en termes de répétabilité, r , et de reproductibilité, R , au moyen d'une analyse collaborative.

ANALYSE COLLABORATIVE

Comme pour chacune des méthodes microbiologiques évaluées au cours de ce programme européen, les échantillons utilisés se divisent en :

- matériaux de référence, à savoir des capsules de gélatine, préparées par le RIVM, contenant de la poudre de lait, contaminée par *Staphylococcus aureus*.
- trois types d'aliments, représentatifs de la diversité du domaine d'application de la méthode, à savoir :
 - ♦ un produit laitier : fromage au lait cru,
 - ♦ un produit carné : viande de bœuf hachée lyophilisée, préparée par le MAFF-CSL,
 - ♦ un produit sec : poudre d'œufs entiers, préparée par le RIVM.

Ils ont tous été contaminés artificiellement, à plusieurs niveaux d'inoculum, à la fois par une ou plusieurs souche(s) appropriée(s)* de *Staphylococcus aureus* et par des souches de staphylocoques à coagulase négative, ainsi que par une flore autochtone simulée pour le fromage et la viande (cf tableau 1).

* Le fromage a ainsi été contaminé par plusieurs souches, typiques et atypiques, d'origine laitière, de *Staphylococcus aureus*.

Quel que soit leur niveau de contamination, leur homogénéité et leur stabilité ont été vérifiées avant le début de l'étude collaborative.

Les niveaux de contamination s'établissent finalement selon le tableau 1.

tableau 1 : niveaux de contamination des échantillons d'aliments
table 1 : contamination levels of the samples

niveau level	<i>S. aureus</i>	Staphylocoques à coagulase négative coagulase negative staphylococci
témoin (negative)	0	même niveau que <i>S. aureus</i>
bas low	≈ 10 ³ ufc/g ≈ 10 ³ cfu/g	same level as <i>S. aureus</i>
moyen medium	≈ 10 ⁴ à 10 ⁵ ufc/g ≈ 10 ⁴ to 10 ⁵ cfu/g	
haut high	≈ 10 ⁵ à 10 ⁶ ufc/g ≈ 10 ⁵ to 10 ⁶ cfu/g	
référence (reference)	≈ 5000 ufc /capsule ≈ 5000 cfu / capsule	

Après un pré-essai entre les trois laboratoires partenaires pour bien cerner les difficultés de la méthode et fixer le mode opératoire, l'étude collaborative a eu lieu en juin 1999 et a finalement rassemblé 24 laboratoires de 16 pays européens.

Les analyses ont été effectuées en double aveugle et la plupart des laboratoires ont testé les deux parties de la norme sur tous les échantillons.

Les principes des méthodes ISO 6888-1 et -2 se décomposent en plusieurs phases successives à partir de la préparation de la suspension mère

♦ Pour ISO 6888-1 :

- ensemencement en surface de deux séries de boîtes de milieu gélosé sélectif de Baird-Parker, à partir de la suspension mère ou de ses dilutions décimales,
- incubation en aérobiose à 37°C et comptage des colonies typiques et/ou atypiques à 24 et 48h,
- test de confirmation par recherche de la coagulase, pratiqué sur un certain nombre de colonies typiques et/ou atypiques.

♦ Pour ISO 6888-2 :

- ensemencement en profondeur de deux séries de boîtes de milieu gélosé sélectif RPFA, à partir de la suspension mère ou de ses dilutions décimales,
- incubation en aérobiose à 37°C et comptage des colonies typiques à 24 et 48h.

RESULTATS

Les résultats des organismes préparant les échantillons ont montré que leur stabilité et leur homogénéité étaient satisfaisantes.

Puis, le dépouillement des rapports d'essais a permis de constater que leur transport et leur réception avaient été globalement satisfaisants.

En ce qui concerne les résultats, ils ont mis en évidence des discordances entre laboratoires quant à la classification en colonies typiques et atypiques sur milieu de Baird Parker.

Pour ce qui est des comptages, les résultats ont ensuite été transformés en log. Puis les valeurs aberrantes ont été éliminées avant le calcul des valeurs de répétabilité et de reproductibilité.

Ces calculs ont été effectués selon les indications de la norme ISO 5725, comme à l'accoutumée, mais aussi selon le projet de norme EN ISO 16140 qui, s'appuyant sur la détermination de la médiane, semble plus adapté aux méthodes microbiologiques.

Les tableaux 2 et 3 présentent les valeurs obtenues, en appliquant ce dernier mode de calcul. Mais, en fait, l'une ou l'autre façon de calculer aboutissent quasiment aux mêmes résultats.

Tableau 2 : répétabilité et reproductibilité de la méthode ISO 6888-1 : milieu de Baird-Parker et test de la coagulase

Table 2 : repeatability and reproducibility of ISO 6888-1 : Baird-Parker medium and coagulase test

Echantillons samples	Nombre labos number labs	moyenne (log) mean	r (log)	R (log)
Fromage <i>cheese</i>	19	3.33	0.50	0.52
	19	5.12	0.17	0.47
	19	6.06	0.33	0.66
Viande <i>meat</i>	18	3.27	0.33	0.48
	18	4.20	0.19	0.47
	18	6.19	0.19	0.39
Œuf <i>egg</i>	20	3.17	0.25	0.32
	20	4.10	0.25	0.29
	20	5.23	0.21	0.30
Référence	20	3.69	0.19	0.39

avec / with

r : répétabilité. En échelle log signifie que la différence logarithmique obtenue entre deux répétitions dans le même laboratoire a une probabilité de 95% d'être inférieure à r.

r : repeatability. In a log scale, it means that the log difference between two replicates performed in the same laboratory has a 95% probability of being lower than r

R : reproductibilité. En échelle log signifie que la différence logarithmique obtenue entre deux analyses dans des laboratoires différents a une probabilité de 95% d'être inférieure à R.

R : reproducibility. In a log scale, it means that the log difference between the same analyses performed in different laboratories has a 95% probability of being lower than R

Tableau 3 : répétabilité et reproductibilité de la méthode ISO 6888-2 : milieu RPFA

Table 3 : repeatability and reproducibility of ISO 6888-2 : RPFA medium

Echantillons samples	Nombre labos number labs	moyenne (log) mean	r (log)	R (log)
Fromage cheese	18	3.25	0.25	0.27
	18	5.03	0.13	0.33
	18	6.00	0.17	0.32
Viande meat	17	3.16	0.25	0.32
	17	4.13	0.21	0.28
	17	6.08	0.21	0.33
Œuf egg	19	3.25	0.33	0.38
	19	4.20	0.17	0.32
	19	5.32	0.25	0.39
Référence	19	3.85	0.17	0.31

Les tableaux 2 et 3 montrent, qu'à l'exception du fromage analysé avec le milieu de Baird-Parker, les valeurs de répétabilité et de reproductibilité varient peu en fonction du niveau de contamination. Elles sont, en outre, globalement meilleures avec le milieu RPFA. Le tableau 4 résume les valeurs moyennes de fidélité obtenues selon les deux méthodes.

tableau 4 : valeurs moyennes de fidélité des méthodes ISO 6888-1 & -2

table 4 : mean precision of ISO 6888-1 & -2 methods

aliments food	6888-1 Baird-Parker		6888-2 RPFA	
	r (log)	R (log)	r (log)	R (log)
fromage cheese	0.33	0.55	0.18	0.31
viande meat	0.27	0.45	0.22	0.31
œuf egg	0.24	0.3	0.25	0.36

Pour mémoire, rappelons ici les valeurs obtenues sur le lait en regroupant les résultats de plusieurs essais interlaboratoires organisés par CECALAIT (cf Lettre de CECALAIT, n°20) :

- r(log) = 0.52 et R (log) = 1.13 pour le milieu Baird-Parker;
- r(log) = 0.19 et R(log) = 0.43 pour le milieu RPFA.

Ces valeurs sont globalement plus élevées que ci-dessus. Il faut cependant considérer que :

- d'une part, elles proviennent de laboratoires beaucoup plus divers que les participants au programme européen;
- d'autre part, comme nous l'avons souligné en son temps (cf Lettre de CECALAIT, n°20), elles sont liées à des pratiques de certains laboratoires s'éloignant sensiblement des protocoles expérimentaux normalisés, notamment dans le cas du milieu Baird-Parker.

A l'inverse, le fait d'observer en milieu RPFA, avec le lait, des valeurs de répétabilité voisines de celles obtenues avec le fromage, semble indiquer que les valeurs issues de ce programme européen ne constituent pas un objectif hors de portée de laboratoires d'envergure nationale ou locale, moins expérimentés.

Par ailleurs, l'ensemble de l'étude n'a, mis en évidence aucune association particulière entre certains milieux commerciaux et certaines anomalies, ni aucun effet lié à la flore autochtone annexe. Celle-ci peut cependant se révéler gênante si le milieu RPFA n'est pas ensemencé en profondeur selon les prescriptions de la norme, mais en surface, comme c'est parfois le cas dans la pratique.

CONCLUSIONS

A l'issue de cette étude, les méthodes ISO 6888-1 & -2 apparaissent satisfaisantes. Des recommandations pour l'évolution des normes ont néanmoins été transmises au CEN et à l'ISO et ont toutes été acceptées. Il s'agit de :

- ♦ reprendre dans un amendement aux normes ISO 6888-1 & -2, les données de fidélité déterminés dans cette étude,
- ♦ exprimer ces données selon le projet EN ISO 16140,
- ♦ accorder un statut équivalent aux deux parties de la norme,
- ♦ réexaminer la description des colonies typiques, atypiques et de genre autre que *Staphylococcus*, donnée dans le texte de la norme ISO 6888-1.

DES REFLEXIONS SUR L'EVOLUTION DES CRITERES EN FRANCE

Par ailleurs, il se dessine une évolution des critères microbiologiques concernant les staphylocoques dans les produits laitiers.

Une note de la DGAL, datée du 19/7/1999 :

- suggère qu'il serait préférable de procéder à la recherche d'entérotoxines staphylococciques 24 à 48 h après emprésurage, quel que soit le type de technologie fromagère et quel que soit le résultat du dénombrement au moment de la mise sur le marché (cf Lettre de Cecalait n° 31).
- recommande que, dans la démarche d'autocontrôle propre à leur technologie, les producteurs dénombrent les staphylocoques à l'étape la plus à risque des produits, c'est à

dire, en général, 24 à 48h après emprésurage et recherchent la présence de toxines pour tout dépassement du critère M.

Une réflexion sur ce dernier point a eu lieu au sein du groupe de travail « Microbiologie et analyse des risques » du Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France (CSHPF). La proposition, adoptée par ce groupe le 10/2/2000, est d'effectuer le dénombrement de *Staphylococcus aureus* dans les fromages à l'étape la plus à risques, c'est à dire 24 à 48h après le début de la coagulation du lait, mais d'élever la valeur seuil du critère M de deux puissances de 10.

Pour l'heure, le processus de validation de cette proposition par les instances de régulation suit son cours.

Conclusion générale

La méthode de référence de dénombrement des staphylocoques a été trouvée globalement satisfaisante à l'issue de cette étude collaborative de grande ampleur. Parmi les recommandations formulées dans les conclusions, celles qui concernent l'intégration des données de fidélité vont être prises en compte très rapidement puisqu'elles ne nécessitent qu'une rédaction d'amendement et non pas une révision d'ensemble de la norme. Le statut équivalent accordé aux deux méthodes décrites dans la

norme constitue également une évolution notable de ce texte. Par ailleurs, une modification des critères concernant ces germes dans les fromages a été proposée.

Abréviations

CEN : Comité Européen de Normalisation
cfu : colonie formant unité = **ufc : unity forming colony**
CSHPF : Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France
DGAL : Direction Générale de l'Alimentation
ISO : International Standardization Organization
MAFF-CSL : Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. Central Science Laboratory
RIVM : Rijks Instituut voor Volksgezondheid en Milieu
RPFA : Rabbit Plasma Fibrinogen Agar : milieu gélosé au plasma de lapin et au fibrinogène bovin

Bibliographie

- ♦ Arrêté ministériel du 30/3/1994 relatif aux critères microbiologiques auxquels doivent satisfaire les laits de consommation et les produits à base de lait lors de leur mise sur le marché. JO du 21/4/1994, p. 5883-5886.
- ♦ Note de service de la DGAL du 19/7/1999 (DGAL/ SDHA/ N 99-8113), concernant les techniques de détection et d'identification des entérotoxines staphylococciques dans les produits laitiers

Normes et projets de normes parus récemment (reçus entre Août et Décembre 2000)

NORMES FIL

FIL 12C :2000 BEURRE Détermination de la teneur en sel.

Il s'agit de la version définitive de la norme provisoire de 1988. C'est donc toujours la méthode de Mohr qui est décrite, avec quelques modifications rédactionnelles, un avertissement par rapport à la toxicité d'un réactif et plus de détails sur la préparation de l'échantillon pour essai. C'est une norme commune FIL/ISO/AOAC (ISO : 1738 :1997 ; AOAC 960.29)

FIL 141C :2000 LAIT ENTIER Détermination des teneurs en matière grasse laitière, en protéines et en lactose. *Lignes directrices pour l'utilisation des appareils de dosage par absorption dans le moyen infrarouge.*

Il s'agit de la version définitive de la norme provisoire de 1996, avec d'importantes modifications rédactionnelles. C'est également une norme commune FIL/ISO/AOAC (ISO : 9266:1999 ; AOAC 972.16)

FIL 156A:2000 LAIT ET PRODUITS LAITIERS Détermination de la teneur en zinc. *Méthode par spectrométrie d'absorption avec flamme.*

Il s'agit de la version définitive de la norme provisoire de 1992. C'est également une norme commune FIL/ISO/AOAC (ISO/CD 11813)

FIL 185:2000 LAIT ET PRODUITS LAITIERS Détermination de la teneur en azote. *Méthode pratique par combustion selon le principe de Dumas.*

Après incinération de la prise d'essai et transformation des composés azotés en azote moléculaire, les appareils de Dumas le quantifient au moyen d'un détecteur de conductivité thermique. Cette norme –provisoire- est commune à la FIL, à l'ISO (ISO/CD 14891) et à l'AOAC.

FIL 182:1999 MATIERE GRASSE DE LAIT Préparation d'esters méthyliques d'acides gras. Cette norme provisoire FIL/ISO/AOAC (ISO :DIS 15884) se base sur la méthylation des glycérides par catalyse basique, suivie d'une neutralisation. Elle propose, en outre, une méthode annexe de transestérification par catalyse acide, applicable à la matière grasse partiellement liposylée.

FIL 184:1999 MATIERE GRASSE DE LAIT Détermination de la composition en acides gras par chromatographie en phase gazeuse. Leurs esters méthyliques, préparés selon la procédure décrite ci-dessus sont séparés et déterminés par chromatographie capillaire en phase gazeuse et quantifiés par référence à une matière grasse laitière de composition connue.

C'est encore un texte –provisoire- commun à l'ISO, la FIL et l'AOAC (ISO :DIS 15885).

FIL 183:1999 Guide pour l'évaluation normalisée des tests d'inhibiteur microbien. En fournissant un cadre commun pour les procédures d'évaluation et l'interprétation des essais d'inhibiteurs

microbiens, ce texte a pour ambition de permettre une comparaison plus facile des résultats et des données issues d'essais et études différents.

Ce texte –provisoire- a été élaboré en commun entre l'ISO, la FIL et l'AOAC, mais il n'y a pas, pour l'heure, de textes ISO ou AOAC correspondants.

↳ Pour les trois normes suivantes, nous vous avons déjà informés de leur parution dans la Lettre de Cecalait n° 32. Mais, disposant maintenant des textes, nous pouvons préciser que :

- les modifications par rapport aux versions antérieures sont essentiellement d'ordre rédactionnel pour :

- ◆ **FIL 73B :1998. LAIT ET PRODUITS LAITIERS.**

Dénombrement des coliformes.

&

- ◆ **FIL 83A :1998. LAIT ET PRODUITS A BASE DE LAIT.**

Détection de la thermonucléase des staphylocoques coagulase positive.

- pour la norme provisoire **FIL 181 :1998. PRODUITS LAITIERS SECS. Dénombrement de *Bacillus cereus***: technique NPP, le texte décrit un protocole en plusieurs étapes :

- ◆ enrichissement en milieu sélectif liquide (Bouillon Polymyxine tryptone soja),
- ◆ ensemencement de boîtes de milieu sélectif solide : mileu PEMBA ou MYP, suivi d'une incubation à 37°C, respectivement 30°C,
- ◆ confirmation de colonies typiques ou atypiques par les tests de fermentation du glucose, de réduction du nitrate et de Voges-Proskauer.

NORMES INTERNATIONALES ET FRANCAISES

NF EN ISO 1736, décembre 2000, AFNOR V 04-346 (*ICS 67.100.10 : lait et produits laitiers transformés*) LAIT SEC ET PRODUITS A BASE DE LAIT SEC Détermination de la teneur en matière grasse. Méthode gravimétrique (méthode de référence)

Ce texte reprend en norme française la norme ISO parue en mars 2000, remplace le projet de même intitulé, paru en 1998, et annule la norme précédente V 04-346 de décembre 1985.

NF EN ISO 8381, août 2000, AFNOR V 04-050 (*ICS 67.100.99 : autres produits laitiers*) ALIMENTS A BASE DE LAIT POUR ENFANTS EN BAS AGE. Détermination de la teneur en matière grasse. Méthode gravimétrique (méthode de référence).

Ce texte remplace le projet de même intitulé, paru en 1998, et annule la norme précédente V 04-050 de décembre 1988.

Pour ces deux textes, les principales modifications méthodologiques par rapport aux textes antérieurs portent sur la **possibilité d'utiliser du pentane en lieu et place de l'éther de pétrole** et sur la possibilité d'utiliser une solution de rouge-Congo pour mieux voir l'interface entre le solvant et la couche aqueuse.

NF ISO 11843-1 & NF ISO 11843-2, AFNOR X 06-048-1 & X 048-2) CAPACITE DE DETECTION Partie 1 (décembre 1998) :

termes et définitions. Partie 2 (septembre 2000) : méthodologie de l'étalonnage linéaire.

Ces textes reprennent en normes françaises les normes ISO (partie 2, parue en mars 2000) de même numéro. La partie 1 donne les définitions, en français et en anglais, des principaux termes utilisés dans le cadre de la capacité de détection d'une différence entre l'état réel d'un système et son état de base, notamment celles de la fonction d'étalonnage, des valeurs critiques, de la valeur minimale détectable de la variable nette d'état. La partie 2 fournit des méthodes de base pour élaborer des plans d'expérience destinés à estimer ces valeurs critiques et minimale dans le cas d'une fonction d'étalonnage linéaire.

NORMES FRANCAISES

NF V 04-210, septembre 2000, (ICS 67.100.10 : lait et produits laitiers transformés). LAIT. Détermination de la teneur en matière grasse. Méthode acido-butyrométrique

Ce texte remplace le projet de même intitulé, paru en 1999, et annule la norme précédente V 04-210 de décembre 1990. Cette nouvelle version prend en compte les spécifications nouvelles concernant le ratio des isomères méthyl-3 butanol 1 et méthyl-2 butanol 1 dans l'alcool amylique. (cf Lettre de CECALAIT, n° 33).

NF V 08-105, octobre 2000. MICROBIOLOGIE DES ALIMENTS. Principes de base de l'impédancemétrie appliquée aux examens microbiologiques

Ce texte remplace le projet de même intitulé, paru début 2000. Il donne les principes de base pour la recherche et le dénombrement des microorganismes en général ou de groupes particuliers par mesurage direct ou indirect de l'impédance.

XP V 08-062, octobre 2000. MICROBIOLOGIE DES ALIMENTS.. Méthode de dénombrement de *Listeria monocytogenes*. Méthode de routine. L'allègement principal par rapport à la méthode de référence consiste à n'ensemencer qu'une boîte de milieu sélectif OXFORD et une boîte de milieu PALCAM par dilution, au lieu de 2 boîtes de milieu PALCAM. En outre, la durée d'incubation est d'emblée de 48h et non pas de 24h, suivies de 24h supplémentaires.

NF B 35-355 septembre 2000 VERRERIE DE LABORATOIRE. Butyromètres à lait écrémé, double volume

Ce document sert de base pour l'attribution de la marque NF-Instruments de Contrôle des produits laitiers.

↳ Pour les deux normes suivantes, nous vous avons déjà informés de leur parution dans la Lettre de Cecalait n° 34. Mais, disposant maintenant des textes, nous pouvons vous apporter quelques détails supplémentaires.

NF EN 12469, juillet 2000, AFNOR X 42-136 BIOTECHNOLOGIE. Critères de performance pour les postes de sécurité microbiologique.

Ce document remplace la norme NF X 44-201 d'octobre 1984 et sert de base pour l'attribution de la marque NF-Postes de sécurité

microbiologique. D'un texte à l'autre, ce sont des exigences de classification, des exigences techniques de sécurité et des essais qui ont été modifiés.

NF FD V01-001, juin 2000 HYGIENE DES PRODUITS ALIMENTAIRES – Document méthodologique pour l'élaboration des guides de bonnes pratiques d'hygiène.

Ce texte remplace la norme de même numéro, parue en mars 1995. Certains articles y sont réorganisés ou réécrits, notamment pour tenir compte des nouvelles normes parues ou des références du Codex.

PROJETS DE NORMES AFNOR, SOUMIS A ENQUETE

Projet NF EN ISO 5764, AFNOR V 047-205. LAIT. Détermination du point de congélation. Méthode au cryoscope à thermistance.

Projet V 04-600. PRODUITS LAITIERS FRAIS. Spécifications des laits fermentés et des yaourts/yoghourts

Projet NF ISO 13559, AFNOR V 04-023. BEURRE, LAITS FERMENTES ET FROMAGES FRAIS. Dénombrement des microorganismes contaminants. Technique par comptage des colonies à 30°C

➤ à signaler également la parution

↳ de la norme **XP V 03-020-1 décembre 2000.** Détection et quantification des organismes végétaux génétiquement

modifiés et produits dérivés – partie 1 : lignes directrices et exigences.

↳ des normes internationales suivantes

ISO 12080-1 & -2, juin 2000 LAIT ECREME EN POUDRE. Détermination de la teneur en vitamine A. Partie 1 : méthode colorimétrique. Partie 2 : méthode par chromatographie en phase liquide à haute performance.

ISO 14378, juin 2000 LAIT ET LAIT EN POUDRE. Détermination de la teneur en iode. Méthode par chromatographie en phase liquide à haute performance.

ISO 8196-1 & -2, juin 2000 LAIT. Définition et évaluation de la précision globale de méthodes indirectes d'analyse du lait. Partie 1 : attributs d'analyse de méthodes indirectes. Partie 2 : étalonnage et contrôle de la qualité dans les laboratoires laitiers.

ISO 3890-1 & -2, août 2000 LAIT ET PRODUITS LAITIERS. Détermination des résidus de composés organochlorés (pesticides). Partie 1 : considérations générales et méthodes d'extraction. Partie 2 : méthodes d'essai pour la purification des extraits bruts et tests de confirmation.

↳ D'un texte concernant la verrerie

Nf EN ISO 1042 septembre 2000, AFNOR B 35-307 Fioles jaugées à un trait.

Du côté de la biblio

Vous trouverez ci-joint la liste complète des références repérées pour notre base de données sur les techniques analytiques laitières au cours du dernier trimestre.

Si vous souhaitez obtenir des précisions sur ces références, ou la copie d'un document signalé, n'hésitez pas à prendre contact avec nous.

➤ A signaler également la parution

• **PFOHL-LESZKOWICZ A.** Les mycotoxines dans l'alimentation : évaluation et gestion du risque. Technique & Documentation Lavoisier, 1999, 478 pages.

• **BERTRAND D. ; DUFOUR E.** (coordonnateurs). La spectroscopie infra-rouge et ses applications analytiques. Technique & Documentation Lavoisier, Collection Science et Techniques Agro-alimentaires, 592 pages

• **DACOSTA Y.** La bioprotection des aliments. Y. Dacosta Editions., 2000, 229 pages (*sur les bactériocines*)

• **Codex Alimentarius VOLUME 12** Normes Codex pour le Lait et les Produits Laitières

http://www.codexalimentarius.net/STANDARD/volume12/vol_12f.html

• **Le n° 347, 2000, du bulletin FIL** est un numéro spécial consacré aux produits laitiers biologiques.

• **Dans le bulletin FIL n° 348, 2000** un article (p. 15-42) sur les différents systèmes nationaux de paiement du lait, écrit sur la base des réponses à un questionnaire FIL sur la question.

• **Dans le bulletin FIL n° 353, 2000**, les actes de la semaine nutrition de la FIL, qui en octobre 1999, à San-Francisco, avait été consacrée « aux produits laitiers et aux maladies cardiovasculaires » .

• **Dans le bulletin FIL n° 354, 2000**, les actes du symposium international de la FIL, qui en avril 2000, à Chypre, avait été consacré à la « stratégie de développement pour le secteur du lait de brebis et de chèvre »

RENDEZ-VOUS

➤ MANIFESTATIONS FIL

7 Janvier 2001

BRUXELLES, BELGIQUE

Diagnostic et contrôle de la paratuberculose à la ferme

7-11 Mai 2001

BUENOS AIRES, ARGENTINE

Semaine Legislation

13-18 mai 2001

SAN PELLEGRINO, ITALIE

Semaine analytique et symposium

➤ AUTRES MANIFESTATIONS

19-21 décembre 2000

PARIS

Les nouveaux risques alimentaires : OGM, contaminants, germes virulents

7-8 février 2001

Hôtel Novotel Vaugirard, PARIS

Nouvelles méthodes de contrôle et de traçabilité des OGM

28-29 mars 2001

AGORAL 2001, DIJON, FRANCE

Les outils biologiques dans les procédés et techniques d'analyse

1-4 avril 2001

ISTANBUL, TURQUIE

11e Congrès Européen de Microbiologie Clinique et des maladies infectieuses

22-27 avril 2001

SEOUL, COREE DU SUD

11^e Congrès IUFOST

(Congrès Mondial des Sciences et Technologies de l'Alimentation)

13-15 juin 2001

EDE, PAYS-BAS

NIZO dairy conference on food microbes

RENSEIGNEMENTS

FIL Secrétariat
41, square Vergote
B-1030 BRUXELLES BELGIQUE

Tel : 32/2.733.1690
Fax : 32/2.733.04.13
mel : info@fil-idf.org
<http://www.fil-idf.org>

Institut Supérieur de l'Alimentation

tel : 01 43 25 11 85

Development Institute International

tel : 01.40.06.95.28

AGORAL
F 91744 MASSY Cedex, FRANCE

tel : (33)/(0)1.69.93.50.81
fax : (33)/(0)1.69.93.50.44
mel : agoral@ensia.inra.fr

Secrétariat du Congrès
ESCMID Executive Office
c/o AKM Congress Service
P.O Box CH-4005 BASEL, SUISSE

tel : 41/61.686.77.11
fax : 41/61.686.77.88
mel : info@akm.ch

fax : 82/2.553.84.53
www.congress2001.or.kr

Sarah WILKINSON
NIZO Dairy Conference Secretariat
Elsevier Science
The Boulevard
Langford Lane, Kidlington
OXFORD OX5 1GB, ROYAUME-UNI

Tel : 44/1865 843691
fax : 44/1865 843958
mel : sm.wilkinson@elsevier.co.uk
www.elsevier.nl/locate/nizodairy2001

La filière en deuil

Le 19 octobre 2000, Rémy GRAPPIN s'est éteint dans sa soixante-deuxième année.

Ingénieur de recherche à l'INRA de Poligny depuis 1964, il prend la succession de Pierre ROUSSEAU à la direction de la Station de Recherche en Technologie et Analyse Laitière de Poligny en 1984, responsabilité qu'il assurera jusqu'à ce que sa santé ne le lui permette plus en 1999.

Acteur majeur dans la mise en place du paiement du lait selon sa composition dans le cadre de la loi Godeffroy, il contribue avec son collègue René JEUNET à la création des premiers laboratoires interprofessionnels dont ils seront les conseillers scientifiques et techniques durant des années, et parallèlement à la mise en place et l'animation d'un service de contrôle qualité des laboratoires en collaboration étroite avec l'Institut de l'Élevage et le CNIEL.

Rémy GRAPPIN s'est fait connaître également par ses nombreuses publications sur les méthodes d'analyse et leur précision. Ses apports sur les performances analytiques des méthodes, leurs principes et les éléments influençant leur précision, ont permis de définir des principes d'utilisation encore valables aujourd'hui.

Conscient de l'importance et de la dimension stratégique des aspects analytiques pour la filière laitière, Rémy GRAPPIN s'impliquera très tôt dans l'activité de normalisation des méthodes d'analyse du lait et des produits laitiers tant au niveau national qu'international. Il assurera ainsi la présidence de la Commission des Méthodes d'Analyse de la FIL pendant plusieurs années en même temps que celles de plusieurs groupes d'experts (Protéines, Méthodes Instrumentales, Statistiques, notamment) dont sont issues des normes toujours en usage. Scientifique internationalement reconnu, il y fera prévaloir les points de vue de la France pour les méthodes de caractérisation du lait et des produits laitiers.

C'est également à l'initiative de Rémy GRAPPIN, et grâce aux liens créés avec l'Institut de l'Élevage et le CNIEL, que peut se concrétiser, à l'aube des années 90, le projet de création d'un organisme chargé de reprendre, développer et généraliser à l'ensemble des laboratoires de la filière des activités de services

assurées de manière jusqu'alors limitée par la Station de Poligny. C'est ainsi que voit le jour le Centre d'Étude et de Contrôle des Analyses en Industrie Laitière, CECALAIT. Le succès rencontré par CECALAIT est depuis lors venu illustrer à la fois la justesse de ses vues et sa capacité à rassembler et convaincre.

Parallèlement à son intérêt marqué pour l'analyse laitière et de la chimio-métrie, Rémy GRAPPIN s'est investi avec passion dans la technologie fromagère, domaine dans lequel les travaux menés sous sa direction ont permis des avancées remarquables notamment dans les mécanismes de formation de la texture et de la saveur.

D'un caractère entreprenant et ouvert aux autres, il a su tisser un remarquable réseau de relations aux plans international, national et régional, avec toute la profession, les collectivités territoriales et le monde de la recherche et de l'enseignement. Fédérateur, il privilégiera toujours autant que possible les collaborations entre organismes et, ainsi, se fera le promoteur d'un projet de pôle agroalimentaire à Poligny et du concept de réseau de laboratoires de référence au niveau international à développer pour la filière laitière.

Également nombreux sont les jeunes chercheurs et les étudiants qui ont pu venir se former sous sa direction et auxquels il a su transmettre une partie de son savoir. De même, il a su encourager et favoriser les échanges avec les organismes de recherche français et étrangers, en accueillant des chercheurs de l'étranger ou facilitant les formations à l'étranger des scientifiques de la Station de Poligny.

Rémy GRAPPIN a montré l'exemple d'un chercheur et d'un scientifique accompli. Il a tracé une voie dans laquelle il s'est engagé avec ses collaborateurs et amis. Ceux-ci continueront à la suivre et Rémy restera à jamais dans nos mémoires.

O.LERAY

La Lettre de CECALAIT est éditée par CECALAIT, BP 89, 39801 POLIGNY CEDEX
CECALAIT : association. Président : Laurent DEVELET ; Vice-Président : Michel PLACE;
Trésorier : Jean SEEGERS ; Directeur : Hugues DAMOUR
Directeur de la publication : Laurent DEVELET
Responsable de la rédaction : Annette BAPTISTE
Impression : CECALAIT, BP 89, 39801 POLIGNY CEDEX
4^e trimestre 2000
Dépôt légal : à parution
ISSN : en cours