

Utilisation du charm II test pour le dépistage des résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires d'origine animale

Autor(en): **Edder, Patrick / Corvi, Claude**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchungen und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **92 (2001)**

Heft 2

PDF erstellt am: **22.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-981910>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Utilisation du Charm II test pour le dépistage des résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires d'origine animale*

Patrick Edder et Claude Corvi, Service de protection de la consommation, Genève

Introduction

L'utilisation du Charm II test comme méthode de dépistage des résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires d'origine animale est de plus en plus courante. De nombreux laboratoires pratiquant ce type d'analyses ont fait l'acquisition de cette technique et l'utilisent aujourd'hui en routine.

Les antibiotiques sont largement utilisés dans les élevages d'animaux destinés à la consommation humaine ou produisant des denrées alimentaires. Ils assurent une bonne santé des animaux, une bonne croissance et par conséquent un gain de productivité. Il est fréquent de retrouver des résidus de ces substances dans les viandes, les abats (foie, reins), les poissons, les œufs, le lait et le miel. Concernant le miel, des antibiotiques sont fréquemment administrés aux abeilles pour lutter contre la loque, qui est une maladie bactérienne provoquant des ravages dans les ruchers.

Les teneurs maximales en résidus de médicaments vétérinaires dans les denrées alimentaires sont réglementées en Suisse par l'ordonnance sur les substances étrangères et les contaminants (OSEC) et, pour l'Union européenne (UE), par la directive EU 2377/90. Par conséquent, les méthodes d'analyse doivent être quantitatives.

Les antibiotiques utilisés en médecine vétérinaire sont parfois les mêmes que ceux destinés à la médecine humaine: des β -lactames (pénicillines, céphalosporines), des tétracyclines, des aminoglycosides (streptomycine, gentamicine, néomycine, etc.), des sulfamidés, des macrolides (erythromycine, spiramycine, etc.), des chloramphénicol, des quinolones, etc.

Or, actuellement, la résistance microbienne aux antibiotiques est en croissance continue et les conséquences sur l'environnement, la chaîne alimentaire et la santé

* Conférence donnée le 1^{er} septembre 2000 à Muttenz lors de la 112^e assemblée annuelle de la Société suisse de chimie alimentaire et environnementale

humaine pourraient être considérables. Une surveillance accrue, ainsi qu'une utilisation prudente des antibiotiques, sont une préoccupation majeure de la part des milieux médicaux et vétérinaires.

L'usage de ces antibiotiques en médecine vétérinaire va dépendre évidemment du traitement nécessaire, de l'espèce animale, de la législation du pays (par exemple, le chloramphénicol est encore autorisé en Suisse avec une valeur limite de 1 µg/kg, alors qu'il est absolument interdit dans l'UE), d'habitudes régionales et bien sûr de leur prix.

Méthodes d'analyse des résidus d'antibiotiques

La figure 1 présente les structures chimiques des principales familles d'antibiotiques d'intérêt et permet d'observer les importantes différences qu'il existe entre elles. Certaines familles sont constituées de molécules de taille moyenne (~300 g/mole), comme les pénicillines, les sulfamidés, d'autres des molécules de taille beaucoup plus importante (~700–1000 g/mole) comme les aminoglycosides ou les macrolides. Certaines substances ont des propriétés basiques, d'autres acides, voire les deux (amphotères). Leur seul trait commun réside dans le fait que toutes ces molécules sont très polaires. Leur dosage ne peut donc pas être aisément effectué par chromatographie en phase gazeuse, en tout cas pas sans dérivatisation préalable des fonctions polaires. La méthode de choix est donc la chromatographie en phase

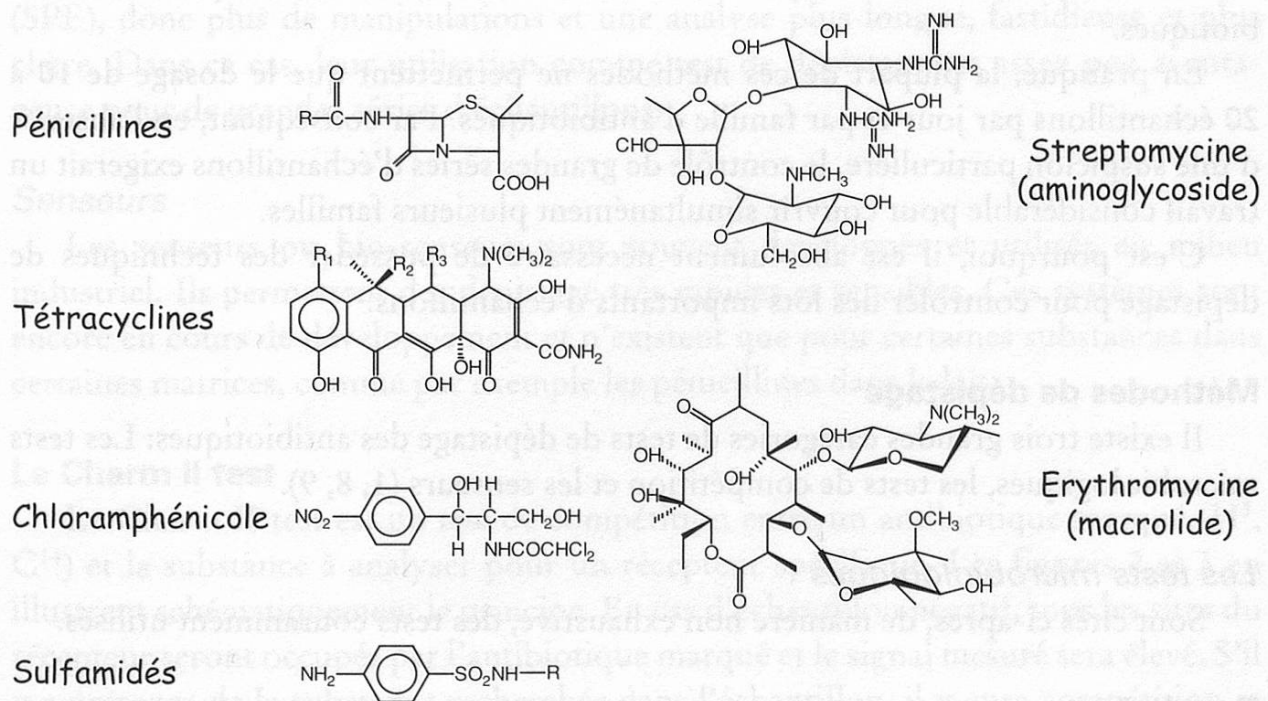


Figure 1 Structures des principales familles d'antibiotiques utilisées en médecine vétérinaire

liquide. Malheureusement, certaines molécules ne possèdent pas de chromophores (par exemple l'érythromycine), ou leur absorbance n'est pas assez importante et/ou spécifique (par exemple les aminoglycosides) pour permettre une détection sensible dans l'UV ou par fluorescence sans dérivatisation.

D'une manière générale, l'analyse des résidus d'antibiotiques dans les aliments pose trois problèmes majeurs:

- Les structures des molécules sont trop différentes pour permettre leur dosage par une méthode d'analyse unique. Les seules méthodes multi-résidus concernent des substances appartenant à la même famille, et sont même parfois déjà difficiles à réaliser.
- Les matrices d'intérêt sont complexes et variées. Certaines très riches en protéines (foie, reins, œufs), d'autres en graisses (lait cru) ou encore en sucres et composés aromatiques (miels). Les méthodes doivent donc être très sélectives et si possible applicables à toutes ces matrices.
- Les méthodes doivent être également quantitatives, car les teneurs maximales en résidus sont réglementées. De plus, les valeurs de tolérance ou limite fixées par la législation varient énormément selon les substances et les matrices. Par exemple, pour la viande, la valeur limite pour le chloramphénicol est de 1 µg/kg, pour les sulfamidés de 100 µg/kg et de 500 µg/kg pour la streptomycine. Les sensibilités requises sont donc très différentes.

Les méthodes d'analyse sont donc dans la plupart des cas complexes, longues avec des étapes de purification et parfois de dérivatisation très spécifiques à une famille (1–7). Il n'existe pas de réelle méthode multi-résidus pour les antibiotiques.

En pratique, la plupart de ces méthodes ne permettent que le dosage de 10 à 20 échantillons par jour et par famille d'antibiotiques. Par conséquent, en l'absence d'une suspicion particulière, le contrôle de grandes séries d'échantillons exigerait un travail considérable pour couvrir simultanément plusieurs familles.

C'est pourquoi, il est absolument nécessaire de posséder des techniques de dépistage pour contrôler des lots importants d'échantillons.

Méthodes de dépistage

Il existe trois grandes catégories de tests de dépistage des antibiotiques: Les tests microbiologiques, les tests de compétition et les senseurs (1, 8, 9).

Les tests microbiologiques

Sont cités ci-après, de manière non exhaustive, des tests couramment utilisés.

Test 4 plaques

C'est actuellement le test de référence des organes de contrôle suisse et européens. Toutefois, ce test est de moins en moins utilisé, car beaucoup trop limité. En effet, il est peu sensible et ne permet pas la mise en évidence de certaines classes

d'antibiotiques (par exemple le chloramphénicol et les quinolones). En outre, il est peu adapté à certaines matrices, comme le foie, où la lecture des zones d'inhibition est difficile. De plus, en cas de résultat positif, il permet de mettre en évidence la présence d'une substance inhibitrice, mais n'indique pas toujours clairement à quelle famille d'antibiotiques cette dernière appartient. Il faut donc par la suite appliquer toute une série de méthodes pour identifier et quantifier la substance en question. Ce test est par contre bon marché et facile de mise en œuvre.

Delvotest

Il s'agit d'un test très sensible, rapide et relativement peu coûteux, mais développé exclusivement pour les analyses de lait et pour la recherche des β -lactames. Il ne répond pas ou peu à certains antibiotiques d'autres familles et son application à des extraits de viande et d'abats s'est révélé infructueux.

Tests de compétition

Ce sont des tests basés sur une compétition entre un antibiotique marqué, soit par un atome radioactif tel l' I^{125} (RIA), soit par un enzyme possédant des groupes chromophores (ELISA), et la substance à analyser pour un récepteur spécifique, souvent un anti-corps.

Ces immuno-essais sont en général très sensibles et semi-quantitatifs. Malheureusement, ils sont souvent spécifiques à une famille, voire à 1 ou 2 substances seulement. Leur coût est relativement élevé. De plus, cette technique nécessite souvent une ou plusieurs étapes de purification, par exemple une extraction sur phase solide (SPE), donc plus de manipulations et une analyse plus longue, fastidieuse et plus chère. Dans ce cas, leur utilisation comme test de dépistage est assez peu avantageuse pour de grandes séries d'échantillons.

Senseurs

Les senseurs ou bio-senseurs sont souvent développés et utilisés en milieu industriel. Ils permettent des dépistage très rapides et sensibles. Ces systèmes sont encore en cours de développement et n'existent que pour certaines substances dans certaines matrices, comme par exemple les pénicillines dans le lait.

Le Charm II test

Le Charm II test est un test de compétition entre un antibiotique marqué (H^3 , C^{14}) et la substance à analyser pour un récepteur spécifique. Les figures 2 et 3 illustrent schématiquement le principe. En cas d'échantillon négatif, tous les sites du récepteur seront occupés par l'antibiotique marqué et le signal mesuré sera élevé. S'il y a présence de la substance recherchée dans l'échantillon, il y aura compétition et les sites des récepteurs seront occupés par les deux espèces, marquée ou endogène, d'où un signal plus faible. Lors d'une série d'analyse, il faudra introduire un échantillon dont on a l'assurance qu'il est exempt de la substance à analyser afin de fixer la

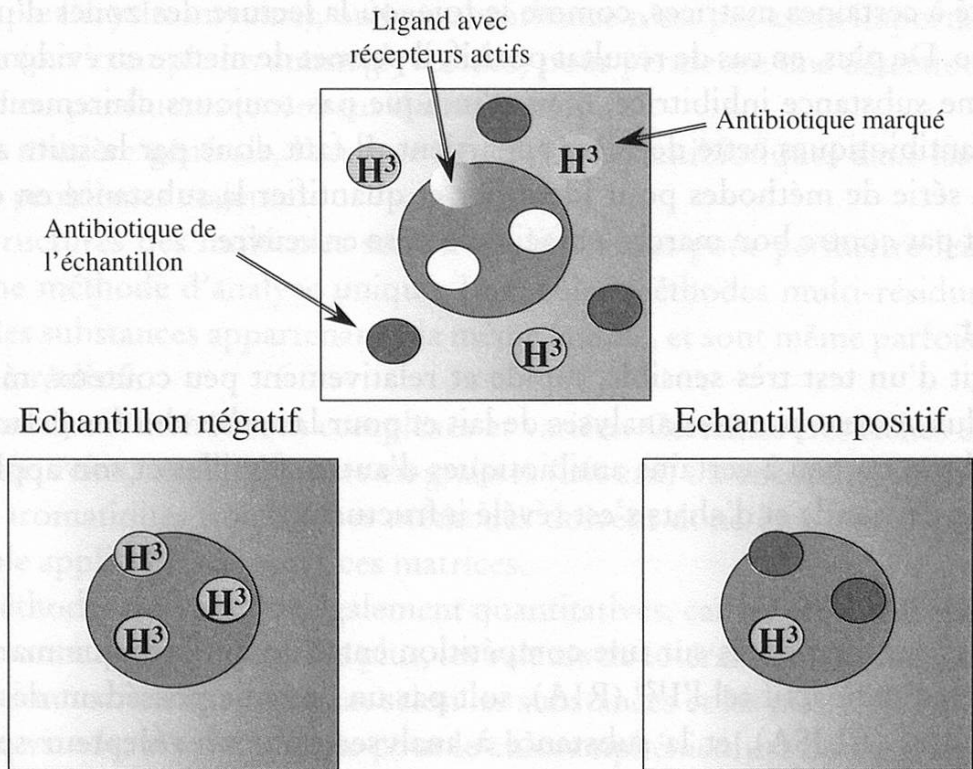


Figure 2 Illustration du principe de fonctionnement du Charm test (compétition)

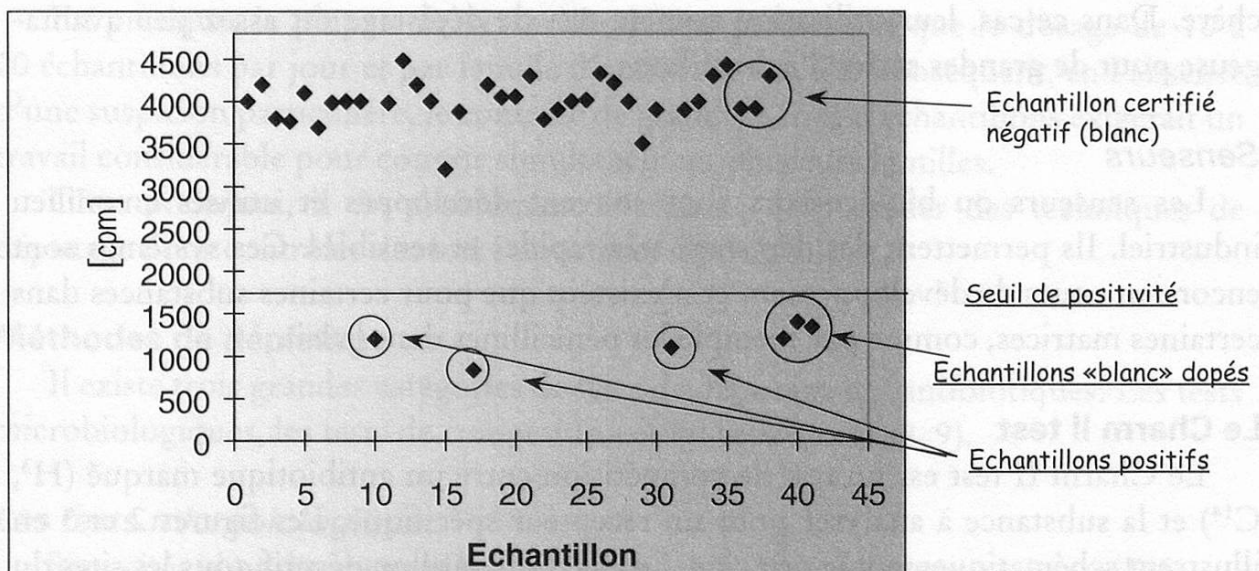


Figure 3 Représentation graphique du fonctionnement du Charm test et de la fixation du seuil de positivité

valeur du blanc. De même, la mesure de ce même échantillon enrichi par l'antibiotique recherché permet de définir un seuil de positivité.

La difficulté majeure est d'établir correctement la valeur du «blanc» lors de petites séries d'analyses, et surtout lorsque la nature des échantillons présente une grande variabilité, comme par exemple les miels.

En pratique, le Charm II test s'effectue avec une préparation classique de l'échantillon (échantillonnage, broyage, homogénéisation), une extraction avec une solution tampon, suivie d'une incubation de 30 min à 80°C. Après incubation, le mélange est centrifugé et le surnageant est récupéré. A partir de cette solution, diverses aliquotes sont prélevées pour la recherche des différentes familles d'antibiotiques. Eventuellement, une dilution sera nécessaire afin de limiter les effets de matrice. Le récepteur spécifique à chaque famille et l'antibiotique marqué correspondant est alors ajouté à l'aliquote prélevée. Après incubation, le mélange est centrifugé et le surnageant éliminé. Le culot restant contient alors les récepteurs spécifiques sur lesquels sont liés les substances marquées ou non. Après dissolution de ce culot solide dans un liquide de scintillation, la mesure est effectuée par détermination de la radioactivité de la substance marquée.

La technique est donc simple, rapide et surtout ne nécessite pas d'étape de purification fastidieuse et n'impose qu'une seule et même préparation d'échantillon pour toutes les familles d'antibiotiques. Pour les analyses de routine, ceci permet de faire le dépistage de 4–5 familles d'antibiotiques (soit 40–50 substances régulièrement utilisées en médecine vétérinaire) dans environ 20–30 échantillons par jour, soit un gain de temps très important par rapport aux méthodes instrumentales conventionnelles.

Domaine d'application

Comme le montre le tableau 1, le Charm II test répond à un large éventail de composés répartis en sept kits principaux, comprenant les β -lactames, les tétracyclines, les sulfamidés, les aminoglycosides avec un kit répondant à cinq antibiotiques et un spécifique à la gentamicine, les macrolides, et les chloramphénicols.

Il manque malheureusement une classe d'antibiotiques importante, les quinolones, qui sont très utilisées en aquaculture et pour l'élevage de la volaille.

La technique est applicable à de nombreuses matrices: viandes, abats (foie, reins), poisson, œufs, lait et miels.

Sensibilité

La sensibilité dépend de la matrice, des dilutions nécessaires afin de limiter les effets de matrice et évidemment des substances, selon leurs affinités pour les récepteurs spécifiques.

Une certaine variabilité d'un lot à un autre pour un même kit a également été observée. La fraîcheur de ces derniers et la qualité de leur conservation sont égale-

Tableau 1

Liste non exhaustive des antibiotiques détectés par le Charm test

<i>Beta-lactames</i>	<i>Sulfamidés</i>	<i>Macrolides</i>
Amoxicilline	Sulfanilamide	Erythromycine
Ampicilline	Sulfaguanidine	Oleandomycine
Cloxacilline	Sulfadiazine	Spiramycine
Dicloxacilline	Sulfapyridine	Tylosine
Oxacilline	Sulfamerazine	Tilmicosine
Nafcilline	Sulfacétamide	Pirlimycine
Pénicilline G	Sulfadimidine	Lincomycine
Piperacilline	Sulfathiazole	Clindamycine
Ticarcilline	Sulfamethoxy-pyridazine	<i>Tétracyclines</i>
Hetacilline	Sulfamethizole	Chlortétracycline
Cefadroxil	Sulfachlorpyridazine	Tétracycline
Cefotaxime	Sulfadoxine	Oxytétracycline
Ceftiofur	Sulfamethoxazole	Doxycycline
Cephalexine	Sulfatroxazole	Demeclocycline
Cephradine	Sulfisoxazole	Métacycline
Cefapirine	Sulfadiméthoxine	Rolitétracycline
<i>Aminoglycosides</i>	Sulfaquinoxaline	Minocycline
Streptomycine	<i>Amphénicols</i>	
Dihydrostreptomycine	Chloramphénicol	
Gentamicine	Florfenicol	
Néomycine	Thiamphénicol	
Kanamycine	Chloramphénicol-glucuronide	

ment des facteurs importants pouvant affecter la sensibilité, car influençant la stabilité des récepteurs et des substances marquées.

D'une manière générale, la sensibilité exigée pour contrôler les résidus dans les denrées alimentaires est toujours satisfaite et en adéquation avec les valeurs de tolérance ou limites fixées par l'OSEC, même pour le chloramphénicol dont la valeur limite est de seulement 1 µg/kg.

A titre d'exemple, le tableau 2 présente pour diverses substances les limites de détection observées au Charm II test lors d'analyses de viande et les valeurs limites ou de tolérance correspondantes.

Sélectivité

La sélectivité est le point crucial de toute méthode analytique.

Faux négatifs

Le Charm II test ne génère que très peu de faux négatifs. Selon notre expérience, d'une part tous les échantillons dopés ont réagit à 100 %, et d'autre part tous les échantillons négatifs au Charm II test ayant fait l'objet d'une confirmation au moyen d'une méthode HPLC n'ont pas montré de traces d'antibiotiques. Pour un organe de contrôle comme notre laboratoire, ce point est très important.

Tableau 2

Limites de détection du Charm test et valeurs limites ou de tolérance fixées par l'OSEC pour les viandes

Famille	Antibiotique	Valeur limite ou de tolérance (muscle) ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Limite de détection ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
<i>Sulfamidés</i>	Sulfadimidine	100	20
	Sulfadiméthoxine	100	10
	Sulfathiazole	100	10
<i>Tétracyclines</i>	Chlortétracycline	100	20
	Oxytétracycline	100	50
	Tétracycline	100	20
β -lactames	Pénicilline G	50	10
	Ampicilline	50	40
	Cefapirine	50	50
<i>Macrolides</i>	Erythromycine	400	100
	Tylosine	100	50
	Tilmicosine	50	20
<i>Aminoglycosides</i>	Streptomycine	100	20
	Gentamicine	100	20
<i>Chloramphénicol</i>	Chloramphénicol	1	1

Faux positifs

Concernant les faux positifs, la situation est très différente et plus complexe. Cette technique peut générer des faux positifs, parfois même en grandes quantités selon les cas.

Ces faux positifs peuvent avoir deux origines. Premièrement, ils peuvent provenir d'effets de matrice via des substances endogènes réactives vis-à-vis des récepteurs. Deuxièmement, des faux positifs peuvent aussi être la conséquence d'une différence importante entre la sensibilité du Charm test et celle de la méthode de confirmation. Ceci d'autant plus que la réponse du Charm test en fonction de la concentration, comme pour tous les tests de compétition, n'est pas linéaire, mais logarithmique.

Le taux de faux positif va donc dépendre des kits utilisés, certains étant plus sélectifs ou sensibles que d'autres, et surtout des matrices. D'une manière générale, la sélectivité est bonne pour les viandes (muscle), le poisson, les œufs et le lait, mais se révèle plus délicate pour les abats (foie, reins) et le miel. Concernant les abats, il semblerait qu'une étape préalable de congélation des échantillons permet de réduire le nombre de faux positifs.

Afin d'illustrer ces problèmes de faux positifs, le tableau 3 présente trois exemples, issus des dernières campagnes de contrôle de résidus de médicaments vétérinaires effectuées dans notre laboratoire:

Tableau 3

Exemples illustrant la problématique des faux positifs

<i>Antibiotiques</i>	<i>Tétracyclines</i>	<i>Sulfamidés</i>	<i>Sulfamidés</i>
<i>Matrice</i>	<i>Miel</i>	<i>Miel</i>	<i>Viande (Volaille)</i>
Nombre échantillons analysés	111	113	105
Nombre échantillon Charm positif	29 (26%)	34 (30%)	24 (23%)
Nombre échantillons confirmés par HPLC	27	11	19
<i>Taux de faux positifs</i>	7%	68%	21%

Le très fort taux de faux positif observé lors de la recherche des sulfamidés dans le miel provient de la présence d'un composé naturel dans le miel, l'acide para-amino benzoïque (PABA), qui interfère avec les récepteurs présumés spécifiques aux sulfamidés. En effet, même de faibles concentrations de PABA, de l'ordre de 5 µg/kg, donnent un signal positif correspondant à 50 µg/kg de sulfadimidine.

De ce fait, dans tous les cas, un résultat positif au Charm II test doit absolument être confirmé par une méthode plus sélective, comme des méthodes GC ou HPLC, permettant d'identifier et de quantifier l'antibiotique mis en évidence.

Dans ces conditions, c'est-à-dire en ne considérant le Charm test que comme une méthode de dépistage, toujours suivie d'une confirmation en cas de résultat positif, l'obtention de faux positifs ne constitue pas une limitation trop importante, pour autant que ladite méthode de confirmation soit fiable et permette de différencier l'élément interférant de l'analyte. La problématique de la présence du PABA lors de la recherche des sulfamidés constitue un exemple frappant de possible double interférence conduisant à des résultats erronés. En effet, le PABA, qui répond donc au Charm II test, peut également fausser l'analyse de confirmation HPLC classique en donnant un pic chromatographique qui co-élue avec certains sulfamidés. Une certaine prudence reste donc de rigueur.

Cette technique de dépistage permet cependant, non seulement d'éliminer rapidement tous les échantillons négatifs, mais aussi de déterminer à quelle famille d'antibiotiques appartient le résidu mis en évidence.

En cas d'observation systématique de faux positifs, il est également nécessaire d'être prudent avant de conclure rapidement à des effets de matrice classiques. En effet, la méthode de confirmation peut parfois être également fautive ou inadaptée. Deux exemples permettent d'illustrer ce cas de figure. Premièrement, le Charm test répond au conjugué chloramphénicol-glucuronide, qui est la forme prépondérante présente dans les tissus (~90% du chloramphénicol est conjugué). La méthode de confirmation doit donc comprendre une étape de déconjugaison (hydrolyse enzymatique) efficace. Deuxièmement, dans le miel, les sulfamidés sont liés aux sucres. Cette forme liée répond au Charm test, quoique moins sensiblement. De ce fait, lors de l'analyse de confirmation par HPLC, une hydrolyse acide préalable est absolument nécessaire afin de libérer les sulfamidés. Sans cette étape, seuls 5 à 10% du contenu réel en sulfamidés seront observés.

Conclusions

Le Charm test est donc une technique de dépistage adaptée au contrôle simultané d'un grand nombre d'antibiotiques dans toutes les matrices d'origine animale. Elle est facile à utiliser, rapide, sensible et efficace, cependant les possibilités de quantification sont limitées.

Si, de notre expérience, pas de cas de faux négatifs sont mis en évidence, elle génère des faux positifs et doit, par conséquent, toujours être suivie d'une confirmation avec une méthode plus sélective (GC, HPLC).

Parfois, l'observation continue d'apparents faux positifs a aussi remis en question la méthode de confirmation, cette dernière devant être additionnée d'étapes de déconjugaison (chloramphénicol) ou d'hydrolyse (sulfamidés liés aux sucres dans le miel).

Résumé

De nombreux laboratoires utilisent aujourd'hui en routine le Charm test pour le dépistage des résidus d'antibiotique dans les denrées alimentaires d'origine animale. Cet article présente le mode de fonctionnement du Charm test, ses avantages, mais également ses limitations, notamment au niveau des faux positifs que cette technique peut engendrer.

Zusammenfassung

Heutzutage wird der Charm Test von vielen Laboratorien routinemässig als Screening-Methode für den Nachweis von Antibiotika in Lebensmitteln (z.B. Fleisch, Eier, Milch und Honig) verwendet.

Diese Publikation stellt das Prinzip des Charm Tests vor. Seine Vor- sowie auch Nachteile werden diskutiert. Insbesondere wird auf die Problematik der falschen positiven Resultate hingewiesen.

Summary "Use of Charm II Test for Screening Antibiotic Residues in Food of Animal Origin"

Today, a lot of laboratories are using routinely the Charm test in order to screen antibiotic residues in food of animal origin. This paper presents the Charm test principle and its advantages, but also its limitations, above all about the false positive results.

Key words

Charm II Test, Screening test, Antibiotic residues

Bibliographie

- 1 Oka, H., Nakazawa, H., Harada, K. and McNeil, J.D.: Chemical analysis for antibiotics used in agriculture. AOAC Int., Edition Arlington (USA) 1995.
- 2 Bobbitt, D.R. and Ng, K.W.: Chromatographic analysis of antibiotic material in food. *J. Chromatogr.* **624**, 153–170 (1992).
- 3 Schenk, F.J. and Callery, P.S.: Chromatographic method of analysis of antibiotics in milk. **812**, 99–109 (1998).
- 4 Edder, P., Cominoli, A. et Corvi, C.: Dosage de résidus de sulfamides dans des denrées alimentaires d'origine animale (foies, rognons, viandes, poissons, œufs lait) par HPLC avec prédérivatisation et détection fluorimétrique. *Trav. chim. aliment. hyg.* **88**, 554–569 (1997).
- 5 Edder, P., Cominoli, A. and Corvi, C.: Determination of streptomycin residues in food by solid phase extraction and liquid chromatography with post-column derivatization and fluorometric detection. *J. Chromatogr. A* **830**, 345–351 (1999).
- 6 Edder, P., Cominoli, A. et Corvi, C.: Dosage simultané de résidus de sept pénicillines dans le lait cru par HPLC. *Trav. chim. aliment. hyg.* **90**, 291–304 (1999).
- 7 Edder, P., Cominoli, A. et Corvi, C.: Dosage HPLC des résidus de spiramycine, tilmicosine, tylosine dans les denrées alimentaires d'origine animale. *Trav. chim. aliment. hyg.* **91**, 172–185 (2000).
- 8 Aerts, M.M.L., Hogenboom, A.C. and Brinkmann, U.A.Th.: Analytical strategies for the screening of veterinary drugs and their residues in edible products. *J. Chromatogr. B.* **667**, 1–40 (1995).
- 9 Korsrud, G.O., Salisbury, C., Fesser, A. and McNeil, J.D.: Investigation of Charm Test II receptor assays for the detection of antimicrobial residues in suspect meat samples. *Analyst* **119**, 2727–2741 (1994).

Adresse du correspondant: Dr Patrick Edder, Service de protection de la consommation, 22 Quai Ernest-Ansermet, CH-1211 Genève 4, E-mail: patrick.edder@etat.ge.ch