



Edito

Lors de la dernière revue de direction du laboratoire (Janvier 2004), il est apparu que la communication interne et externe du LABERCA pouvait être améliorée.

Il a donc été proposé, en complément des rapports officiels d'activité et des publications scientifiques, de publier un nouveau document présentant les thèmes de recherche développés et les principaux résultats acquis.

C'est avec grand plaisir que je salue la première de ces lettres semestrielles, en remerciant leurs auteurs et concepteurs. Je vous en souhaite bonne lecture.

François André

Le LABERCA présent et primé au niveau Européen



Du 10 au 12 mai dernier à Noordwijkerhout (Pays-Bas), s'est tenu le 5^{ème} congrès EuroResidue. Celui-ci, organisé tous les 4 ans par un comité lié à l'université d'Utrecht, couvre tous les aspects relatifs aux résidus de notre alimentation. Il inclut notamment les aspects analytiques, pharmacologiques, toxicologiques, ou encore réglementaires. Cette année encore, la contribution du LABERCA a été significative et remarquée, au travers d'1 conférence plénière, 2 communications orales et 8 communications par affiche. Les sujets traités ont concerné à la fois des aspects très techniques (la suppression d'ion, la spectrométrie de masse de rapport isotopique) et des applications variées (hormones protéiques, stéroïdes endogènes et exogènes, corticostéroïdes). Une discussion animée a également été engagée sur le thème des limites minimales de performance (MRPL) qui se mettent actuellement en place afin d'harmoniser les méthodes de contrôle en Europe.

Pour la première fois depuis sa première édition en 1990, ce congrès a été clôturé par une remise de prix récompensant des chercheurs ayant apporté une contribution particulièrement importante dans le domaine. Le premier de ces prix a été attribué au Dr. Bruno Le BIZEC, directeur adjoint du LABERCA, pour ses travaux de référence notamment dans le domaine des hormones stéroïdes.

En Bref

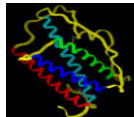
• Formation continue

La 4^{ème} session de la formation School for Advanced Residue Analysis in Food (SARAF) aura lieu du 4 au 15 Octobre prochain. Tous les renseignements sur le site Web (<http://www.saraf-educ.org>).

• Assurance qualité

Le 21 avril 2004, le système de management de la qualité mis en place pour les activités de gestion, conduite et valorisation de projets de recherche, basé sur le référentiel de certification ISO 9001, a été audité pour le seconde fois avec succès.

L'analyse des hormones protéiques : un nouveau challenge



Les somatotropines, plus connues sous le nom d'hormones de croissance, sont des hormones de nature protéique sécrétées par l'hypophyse antérieure ; elles font partie intégrante des hormones présentant une activité anabolisante. Cette propriété a été mise à profit dans les milieux sportif et hippique pour améliorer les performances, ainsi qu'en élevage afin d'accroître la rentabilité de production. Devant la difficulté de fournir suffisamment d'hormone naturelle purifiée, des laboratoires ont mis sur le marché des hormones recombinantes obtenues par génie génétique dont la séquence ne diffère des formes hypophysaires que par quelques acides aminés (1 à 8). L'utilisation non contrôlée de ces substances connues comme préjudiciables pour la santé des animaux et du consommateur a incité certains pays à mettre en place une réglementation, et à anticiper sur le développement potentiel d'un trafic. Qu'il s'agisse du contrôle antidopage (chevaux de courses, humains) ou de sécurité alimentaire, aucune méthode fiable de mesure directe de ces macromolécules dans les fluides biologiques n'est aujourd'hui disponible.

Dans ce contexte, une thématique de recherche est développée visant à mettre en évidence l'administration illégale d'hormones de croissance recombinantes. Si l'identification des hormones natives et recombinantes de plusieurs espèces ainsi que la discrimination entre les différentes formes sont actuellement maîtrisées par la technique du *peptide-mapping* (LC-MS/MS), les travaux en cours se focalisent sur l'extraction et la purification de ces molécules à partir de matrices biologiques dans lesquelles elles se trouvent à l'état de traces (ppb). Différentes approches sont envisagées, elles concernent notamment la chromatographie d'immuno-affinité ainsi que l'électrophorèse bi-dimensionnelle.

Les perturbateurs endocriniens : des études d'exposition avec l'INRA



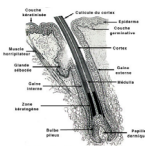
La perturbation endocrinienne est un sujet qui préoccupe les scientifiques depuis déjà de nombreuses années, mais également les pouvoirs publics en raison d'un lien très étroit avec la sécurité des aliments et la santé des consommateurs. Depuis deux ans, le LABERCA mène, en tant qu'Unité Sous Contrat du département AlimH de l'INRA, des projets de recherche visant à développer des outils analytiques performants pour l'identification de substances reconnues comme perturbateurs endocriniens. L'objectif de ces développements est notamment d'asseoir les études d'exposition, et plus largement d'évaluation de risque, qui font actuellement défaut au plan national. Ces premiers projets visent à la fois des composés naturels (phytoestrogènes) et synthétiques (retardateurs de flamme).

Une première étude a déjà abouti à une méthode basée sur la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS), autorisant l'identification de 12 isoflavones, lignanes, et coumestanes dans le lait, à des concentrations de 0,1 à 0,5 ng.mL⁻¹ (ppb). Le recueil de données peut désormais débiter, que l'on s'intéresse aux effets potentiellement bénéfiques ou néfastes de ces molécules ambivalentes, notamment sur les jeunes enfants.

Un second projet, soutenu par l'Agence Française de Sécurité Sanitaire Environnementale (AFSSE) et porté par l'UMR 1089 Xénobiotiques de l'INRA de Toulouse, vise à évaluer l'exposition fœtale aux polybromodiphényléthers (PBDE) et au tétrabromobisphénol-A (TBBP-A). Le LABERCA fournira la base analytique de cette étude, par un développement basé sur la spectrométrie de masse haute résolution (GC-HRMS) réalisé dans le cadre d'une thèse d'université. Ce développement sera également mis à profit pour identifier d'éventuels métabolites de ces composés.



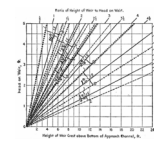
L'analyse de résidus dans les phanères : une voie d'amélioration pour le contrôle



L'urine, les matières fécales ou les tissus, sont des matrices utilisées depuis de nombreuses années pour le contrôle de l'utilisation d'agents xénobiotiques en élevage. Les phanères, et plus précisément le poil, représentent une matrice stratégique pour la mise en évidence de fraudes en élevage associées aux stéroïdes étant donnée la facilité du prélèvement et la durée de détection des résidus fixés. Cependant, les mécanismes et la cinétique d'incorporation de ces xénobiotiques dans le poil restent mal connus en général. Dans ce contexte, un projet a été consacré au LABERCA à l'étude de la fixation de l'acétate de médroxyprogestérone (MPA), du benzoate d'estradiol et de la 17 α -méthyltestostérone dans le poil de bovins.

Le développement d'une méthode de purification spécifique associé à la mise au point de techniques de mesure sélectives et sensibles (GC-MS/MS et LC-MS/MS) a permis d'abaisser nettement les limites de détection. La cinétique d'incorporation a pu ainsi être suivie sur plusieurs mois après l'administration intramusculaire de stéroïdes. Des résidus de stéroïdes ont ainsi pu être mis en évidence pendant plusieurs mois. Des résidus d'esters d'estradiol ont également été identifiés pendant plusieurs semaines ; cette observation permet d'envisager aujourd'hui l'utilisation de cette matrice pour démontrer l'usage illégal d'hormones naturelles en élevage, la détection de la forme ester injectée signant sans ambiguïté une origine exogène.

Spectrométrie de masse et statistiques : une nouvelle approche de l'analyse



Si l'intérêt des techniques statistiques multivariées (MANOVA, ACP, AFD, classification,...) pour le traitement de larges ensembles de données est connu depuis longtemps, leur utilisation dans le domaine de la chimie analytique est beaucoup plus récent. Depuis quelques années, le LABERCA introduit progressivement ces techniques pour l'analyse de données spectrométriques. De premières applications très concluantes concernent la différenciation de composés stéréoisomères (corticostéroïdes dexaméthasone et betaméthasone ; stéroïdes de type androstanediols), sur la base d'une empreinte spectrométrique globale (MS en mode Full Scan) ou spécifique (MS² en mode MRM).

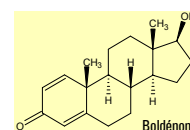
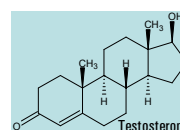
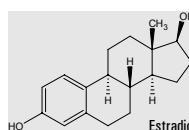
De nouveaux projets faisant appel à ces techniques sont en cours, visant notamment à exploiter leur potentiel à la fois descriptif et prédictif, afin d'étudier et expliquer la variabilité de profils de contamination, pour les familles de composés comprenant différents congénères de type dioxines, PCB, HAP, ... (à paraître).

Cette orientation est aujourd'hui l'objet d'une collaboration avec l'UMR INRA Chimométrie et Sensométrie de l'École Nationale d'Ingénieurs des Techniques Agricole et Alimentaires de Nantes (ENITIAA).

Le cas épineux des hormones endogènes : de nouveaux résultats pour une attente Européenne

La recherche des stéroïdes anabolisants xénobiotiques dans des matrices biologiques aussi diverses que l'urine, les tissus ou encore les phanères, est aujourd'hui généralement bien maîtrisée, que le contexte soit celui de la sécurité des aliments, de la lutte contre le dopage dans l'espèce humaine ou encore dans le domaine des courses hippiques. La situation est bien différente lorsqu'il s'agit de contrôler l'usage illégal des hormones stéroïdes naturelles, c'est à dire différencier l'origine de leurs résidus et répondre à la question : production par l'organisme ou conséquence de l'administration d'une source exogène ? L'administration de ces composés ne provoque qu'un changement mineur de leurs concentrations résiduelles dans les tissus ou les excréta. Ces variations sont a priori considérées comme non significatives eu égard les variations physiologique intra- et inter-individuelles.

Les travaux de recherche conduits au LABERCA depuis 1997 dans ce domaine aboutissent aujourd'hui à des résultats très prometteurs. L'approche actuellement développée par le laboratoire et consistant en la différenciation de l'origine – endogène ou exogène – repose sur la mesure du rapport isotopique ¹³C/¹²C des métabolites et précurseurs principaux de ces stéroïdes



dans l'urine de bovins grâce au couplage chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse de rapport isotopique (GC-C-IRMS). Les précurseurs, également désignés par composés endogènes de référence (ERC), ont la caractéristique de voir leur composition isotopique non affectée par l'administration de stéroïdes gonadiques tels que la testostérone, l'estradiol, la progestérone, ou encore la nandrolone, qui se situent très en aval de leur métabolisme. Ces stéroïdes anabolisants de synthèse ont la particularité d'avoir une composition isotopique en ¹³C appauvrie relativement aux sources endogènes. En revanche, le rapport ¹³C/¹²C de la DHEA et du 5-androstène-3 β ,17 α -diol (ERC) traduisent la composition endogène isotopique en carbone, et dépend directement du type d'alimentation propre à chaque animal. Ainsi, l'observation d'une différence des rapports ¹³C/¹²C précurseurs-métabolites permet de suspecter l'administration exogène d'hormones stéroïdes gonadiques à un animal de production, ceci jusqu'à plusieurs semaines après l'administration.

Ces résultats sont actuellement obtenus dans le cadre d'un projet de recherche du 5^{ème} PCRD, et d'une thèse d'Université.

Dernières Publications

- Pinel G, André F and Le Bizec B. Discrimination of recombinant and pituitary-derived bovine, porcine and human growth hormones by peptide mass-mapping. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2004;52(3):407-414.
- Antignac J-P., Cariou R., Le Bizec B. and André F. New data regarding phytoestrogens content in bovine milk. *Food Chemistry* 2004;87(2):275-281.
- Antignac J-P., Monteau F., Négriloli J., André F. and Le Bizec B. Application of hyphenated mass spectrometric techniques applied to the determination of corticosteroid residue in biological matrices. *Chromatographia* 2004;59:S13-S22.
- Le Bizec B, Maume D, Marchand P, Monteau F, Bichon E, André F. Review: control of anabolic steroid in breeding animals: mass spectrometry, a powerful analytical tool. *Chromatographia*, 2004;59:S3-S11.