



Edito

Voici le 3^{ème} numéro de cette « actualité recherche » du LABERCA. Les précédents numéros ont été bien accueillis si l'on en croit vos réactions et demandes d'expédition régulières. Une version anglaise a été diffusée à nos principaux correspondants européens.

Ce troisième numéro présente nos projets de recherche ayant tous en commun un objectif de meilleure connaissance de nos aliments et de leurs contaminations potentielles. Je vous en souhaite une bonne lecture.

François André.

Le LABERCA et le 6^{ème} PCRD



La réunion d'ouverture officielle du projet BIOCOP a eu lieu les 15 et 16 mars derniers à Bruxelles. Comme annoncé dans notre précédent numéro, ce projet intégré du 6^{ème} PCRD est programmé sur 5 ans et implique une quarantaine de partenaires. Il a pour objectif général le développement de nouvelles stratégies analytiques, basées sur des techniques émergentes de type transcriptomique et protéomique, pour l'analyse de résidus et contaminants dans les aliments. En tant que responsable du groupe de travail « perturbateurs endocriniens », le LABERCA travaille au développement de méthodes analytiques de confirmation (basées sur le couplage LC-MS/MS) pour l'analyse de phytoestrogènes dans des échantillons de lait, de céréales, et de divers produits destinés à l'alimentation infantile. Le laboratoire participe également activement au groupe de travail « facteurs de croissance » notamment en recherchant une méthode d'identification directe de biomarqueurs protéiques plasmatiques pouvant révéler l'administration d'hormones stéroïdes et corticostéroïdes. Enfin, en tant que responsable de l'organisation des activités de formation, le LABERCA s'appuiera sur sa structure d'enseignement SARAF pour harmoniser le contenu et le déroulement des différents stages et workshops proposés durant toute la durée de ce projet.

En Bref

• Formation continue

La 6^{ème} session de la formation School for Advanced Residue Analysis in Food (SARAF) aura lieu du 3 au 14 Octobre prochain. Tous les renseignements sur le site Web (<http://www.saraf-educ.org>).

• Assurance qualité

La certification du système de management de la qualité mis en place par le laboratoire pour ses activités de recherche (référentiel ISO 9001:2000) a été reconduite pour la troisième fois suite à l'audit du 28 avril dernier.

L'approche isotopique (IRMS) : des résultats pour un projet Européen du 5^{ème} PCRD

Le LABERCA est engagé depuis janvier 2002 dans l'un des derniers projets du 5^{ème} Programme Cadre de Recherche et de Développement (PCRD) – ISOSTER – consacré au développement de méthodes innovantes de mise en évidence de l'utilisation illégale des hormones stéroïdes naturelles chez les animaux de production. Neuf équipes sont impliquées dans ce projet dont des laboratoires de lutte contre le dopage dans le milieu du sport (dont celui de Cologne, l'une des références mondiales) ou des courses hippiques (Newmarket, HFL), des laboratoires nationaux de référence spécialisés en sécurité chimique des aliments (BfR, Berlin – TNO, Zeist – QUB, Belfast – CSL, York) mais encore deux des principaux constructeurs de spectromètre de masse de rapport isotopique (SMRI).

Les outils de mesure et la stratégie analytique sont aujourd'hui développés et leur robustesse a été démontrée par l'organisation d'un essai impliquant une dizaine de laboratoires invités. La méthode permet aujourd'hui de démontrer de manière fiable une différence significative en terme de rapport isotopique $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ entre les précurseurs (ou composés endogènes de référence comme la DHEA ou le 5-androsténediol) et les métabolites (étiocholanolone, androstanediol ou 17α -estradiol) du stéroïde anabolisant administré. Cette approche rend possible la démonstration non ambiguë d'une utilisation de la substance plusieurs semaines après son administration. Les résultats ont clairement démontré l'influence de la nourriture de l'animal sur le rapport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ des stéroïdes suivis, ceci sans affecter l'efficacité diagnostique de l'approche. Ces résultats constituent une avancée majeure dans le domaine du contrôle des stéroïdes à « double statut » à savoir naturellement sécrétés par l'organisme (testostérone, estradiol, nandrolone, boldénone...) ou apportés de manière exogène.

Contaminants organiques persistants (POPs) : une vaste étude d'exposition dans les produits de la mer

Le LABERCA participe à un projet de recherche dont l'acronyme est POPINRA et qui est piloté par J-C Leblanc (INAPG, INRA). L'un des principaux objectifs de cette étude est la détermination de l'occurrence des principaux POPs dans différentes espèces de poisson et divers produits de la mer. De part leur situation dans la chaîne trophique et leur teneur ponctuellement élevée en matière grasse (au moins pour certaines espèces de poisson), ce type de denrée est en effet reconnue comme particulièrement sensible eu égard aux POPs. De plus, l'étude des profils de contamination (proportions relatives des différentes substances et congénères recherchés) peut parfois fournir des informations sur les sources et les types de pollution en cause.

Pour chaque échantillon, un monitoring des principaux POPs sera réalisé, incluant 35 molécules dont 17 congénères PCDD/PCDF, 18 congénères PCB (12 ayant des propriétés toxicologiques analogues à celles des dioxines – les PCB « dioxin-like » – et 6 autres présentant d'autres effets – et qualifiés de PCB indicateurs). La quantification de 7 retardateurs de flamme bromés (BDE#28 ; BDE#47 ; BDE#99 ; BDE#100 ; BDE#153 ; BDE#154 et BDE#183) sera assurée sur une partie des échantillons.

Cette étude complète et novatrice, associée en parallèle à la mesure de la composition en métaux lourds, donnera sans aucun doute lieu à une interprétation riche et à une base solide de discussion. Par ailleurs, à travers la collecte d'environ 5565 données (nombre de résultats de mesures estimés sur la base de 159 échantillons et une recherche de 35 composés), cette étude permettra de répondre à un besoin exprimé au niveau Européen concernant l'évaluation du risque lié à ces substances en France.



Hormone de croissance et sécrétagogues : une nouvelle compétence qui s'affirme

Les propriétés anabolisantes de l'hormone de croissance (somatotropine) sont potentiellement mises à profit tant en élevage que dans le milieu hippique pour améliorer les performances, le LABERCA et le Laboratoire des Courses Hippiques (LCH) sont de fait confrontés à cette même problématique. La mise en place d'une thèse Cifre en partenariat avec le LCH situé à Verrières le Buisson (91) depuis septembre 2004 permet ainsi au LABERCA de maintenir son positionnement sur la thématique de recherche visant la mise en évidence de l'administration illégale d'hormones de croissance recombinantes. Le sujet de thèse développé dans ce contexte s'applique au cas particulier de l'administration chez le cheval.

Au delà de l'étude des hormones de croissance elles-mêmes, l'intérêt du LABERCA se porte également sur des substances capables d'induire la sécrétion naturelle des somatotropines : les sécrétagogues. L'étude de ces composés dans une optique de mise en évidence de l'administration de ces substances pour provoquer une sécrétion de somatotropine a donc été envisagée au travers d'un stage de Master Recherche soutenu le 4 juillet.

Une revue des connaissances consacrées à la somatotropine sera présentée lors du prochain congrès « International Symposium on Hormone and Veterinary Drug Residue Analysis » qui se tiendra à Anvers (Belgique) du 16 au 19 mai 2006.

Les perturbateurs endocriniens : trois familles de composés sous haute surveillance

La problématique de la perturbation endocrinienne représente depuis quelques années une préoccupation grandissante pour la communauté scientifique. Un nombre croissant de substances chimiques sont ainsi mis en cause quant à leur impact potentiellement néfaste, notamment sur les fonctions de reproduction et de développement pour des populations particulièrement sensibles (fœtus, jeune enfant). Or, pour ces composés de type résidu ou contaminant, il est bien établi que l'apport alimentaire représente (avec l'environnement) une voie d'exposition majeure. Dans ce contexte, et dans le cadre de sa contractualisation avec le département AlimH de l'INRA, le LABERCA s'intéresse depuis 2002 à trois familles de composés, d'origine naturelle (hormones stéroïdes, phytoestrogènes) ou synthétique (retardateurs de flamme bromés). Les recherches en cours visent d'une part à (ré)-évaluer la production endogène en hormones stéroïdes naturelles de la population en question (enfant prépubère), d'autre part de caractériser l'exposition à ces substances (apport direct via la mère pour le fœtus ou apport via l'alimentation pour le jeune enfant), et enfin de déterminer l'activité hormonale associée à cet apport. L'ensemble de ces travaux en cours devrait ainsi aboutir à la fois à la collecte de données qui font actuellement défaut aux plans national et européen, et à une meilleure caractérisation du danger associé à ces composés.

Les insecticides (Fipronil et Imidaclopride) : mieux connaître l'exposition de l'homme

Suite à la mortalité anormale d'abeilles constatée par la profession apicole, une étude a été initiée au LABERCA visant à déterminer la présence de fipronil et d'imidaclopride dans le miel. Afin d'anticiper une éventuelle crise phytosanitaire, les méthodes développées ont ensuite été étendues à différents types d'aliments. Les premiers travaux ont porté sur le miel et le lait, deux matrices représentatives des produits alimentaires naturels et des baby-foods. Les seuils de quantification des méthodes validées ont été optimisés pour atteindre les niveaux de contaminations attendus, c'est à dire de 25 ng.L⁻¹ pour les résidus de fipronil et inférieurs à 1 µg.L⁻¹ pour les résidus chloronicotiniques (imidaclopride, nitenpyram, thiamethoxam, acétamipride, thiaclopride et clothianidine) dans le lait. Pour le miel, les limites de quantification des méthodes développées ont été déterminées inférieures à 5 µg.kg⁻¹. Ces méthodes ont été appliquées sur de premiers échantillons provenant de produits commercialisés en grandes surfaces. Des miels ont ainsi été analysés et la mise en évidence de certains résidus tels que l'imidaclopride et le thiaclopride dans les miels d'importation a été démontrée.

La Boldénone : une nouvelle stratégie de contrôle à l'étude

La boldénone est une hormone stéroïde de type androgénique possédant des propriétés anabolisantes et dont l'utilisation en élevage est interdite au sein de l'UE. Le contrôle de l'usage illégal était jusqu'à peu basé principalement sur l'identification de la 17α-boldénone dans l'urine. De récentes études montrent toutefois une possible (mais non systématique) origine endogène de ce stéroïde dans l'espèce bovine. Un projet de recherche visant l'étude du métabolisme de la boldénone chez les bovins a été conduite au LABERCA. Outre la mise en évidence de métabolites de phase I qui pourraient s'avérer diagnostiques (5β-androst-1-ene-17α-ol-3-one (M2) et la 5β-androst-1-ene-17β-ol-3-one (M4)), la démonstration de métabolites de phase II de la 17β-boldénone (sulphate ou glucuronide) signerait sans ambiguïté la prise exogène de ce stéroïde. Deux méthodes ont été développées en ce sens au LABERCA, l'une consistant en la mesure du stéroïde après séparation des formes libres, glucurono- et sulfo-conjuguées, hydrolyse spécifique et analyse GC-MS/MS (EI), l'autre par l'analyse directe des conjugués par LC-MS/MS (ESI). Cette dernière approche pourrait constituer une innovation majeure et déterminante dans le contrôle difficile de l'usage illégal de la boldénone en élevage.

Dernières Publications

- Antignac J-P., Brosseau A., Gaudin I., André F. and Le Bizec B. Analytical strategies for the direct mass spectrometric analysis of steroid and corticosteroid phase II metabolites. *Steroids*, 2005;70:205-216.
- Le Bizec B., Antignac J-P., Bertrand D., Qannari El M. and André F. Multidimensional statistical analysis applied to electron ionization mass spectra to determine steroid stereochemistry. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 2005;19(4):509-518.
- Pinel G, Bichon E, Poupponeau K, Maume D, Andre F, Le Bizec B. Multi-residue method for the determination of thyreostats in urine samples using LC-electrospray-MS/MS after derivatisation with 3-iodo-benzyl-bromide. *Journal of Chromatography A*, 2005, *sous presse*.
- Laurent C, Marchand P, Feidt C, Le Bizec B, Rychen G. Tissue distribution and bio-concentration factors of PCDD/Fs in the liver and adipose tissue following chronic ingestion of contaminated milk in rats. *Chemosphere*, 2005, 60(7):929-938.
- Debrauwer L, Riu A, Jouahri M, Rathahao E, Jouanin I, Antignac JP, Cariou R, Le Bizec B, Zalko D. Probing new approaches using atmospheric pressure photoionization for the analysis of brominated flame retardants and their related degradation products by LC-MS. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1082(1):98-109.