

Vers des stratégies analytiques globales et non ciblées de recherche de résidus de substances interdites en élevage

Gaud Dervilly-Pinel (laberca@oniris-nantes.fr), Stéphanie Prévost, Ludivine Sérée, Bruno Le Bizec

Oniris, Laboratoire d'étude des résidus et contaminants dans les aliments (Laberca), Laboratoire national de référence pour les promoteurs de croissance et contaminants environnementaux organiques, LUNAM Université, Nantes, France

Résumé

Certaines substances β -adrénergiques peuvent être utilisées chez l'animal d'élevage à des fins zootechniques. Ces β -agonistes peuvent être incorporés à des doses très faibles dans les aliments destinés aux animaux. Ces molécules modifient certains processus biologiques liés à la croissance des tissus en augmentant la lipolyse et la synthèse protéique, en diminuant la lipogenèse et la dégradation des protéines. Ces substances sont considérées comme des « agents de répartition ». Les méthodes classiques dites ciblées permettent de manière routinière de contrôler une quarantaine de β -agonistes dont l'usage est interdit chez les animaux de production. La simplicité relative des procédés de synthèse pour ce type de molécules permet d'envisager une possible circulation sur le marché noir en Europe de substances dont la structure chimique n'a pas encore été officiellement décrite. Cette hypothèse de travail a conduit le LNR français compétent en la matière à développer dès 2007 des stratégies de criblage, non plus ciblées uniquement sur les molécules natives ou leurs métabolites, mais sur des marqueurs moléculaires d'effet, consécutifs à l'administration de la dite substance connue ou pas. Ces approches dites non ciblées ou métabolomiques sont utilisées officiellement depuis 2013 en France pour le contrôle officiel. Il s'agit d'une première mondiale en la matière.

Mots-clés

Anabolisants, agonistes β -adrénergiques, spectrométrie de masse, métabolomique, biomarqueurs, dépistage

Abstract

Towards global and untargeted analytical strategies to screen for banned substance residues in livestock

A number of β -adrenergic agonist drugs may be used for fattening purposes in livestock. When added to feed even at low doses, β -adrenergic agonists modify various biochemical tissue growth processes by increasing lipolysis, decreasing lipogenesis, decreasing protein degradation and increasing protein synthesis. These substances are considered as repartitioning agents. Classical "targeted" analytical methods routinely authorize screening for around 40 forbidden molecules in food animal production. As the organic synthesis of such compounds is relatively simple, the circulation of new molecules that have not yet been described is probable on the black market. This working hypothesis was the starting point for the French National Reference Laboratory to develop alternative detection strategies which were not based on the monitoring of native compounds or their metabolites, but rather on effect-specific molecular biomarkers following animal exposure to, or treatment with, a known or unknown substance. A world first, these untargeted analytical strategies, also known as metabolomic strategies, are officially used in France since 2013 in the context of its national growth promoter monitoring system.

Keywords

Anabolic, β -adrenergic agonist drugs, Mass spectrometry, Metabolomics, Biomarkers, Screening

L'utilisation des promoteurs de croissance en élevage est prohibée au sein de l'Union européenne depuis 1988 (directive 88/146/EC puis directive 96/22/EC). Afin de garantir au consommateur des denrées exemptes de résidus de ce type de substances, un dispositif de surveillance et de contrôle accompagne cette mesure (directive 96/23/EC). S'assurer de l'absence des composés interdits dans les denrées alimentaires d'origine animale requiert le développement de méthodes d'analyse spécifiques et sensibles. Au cœur de cette problématique, la classe des agonistes β -adrénergiques (β -agonistes) (groupe A5 de la directive 96/23/EC) retient particulièrement l'attention. L'usage des β -agonistes en élevage soulève des questions relatives à l'activité pharmacologique des résidus présents dans les denrées animales à l'égard du consommateur. Ces résidus issus d'agonistes préférentiels des récepteurs bêta-2 adrénergiques (β 2-AR) (prédominants au niveau vasculaire et bronchique) demeurent capables d'activer les récepteurs bêta-1 adrénergiques (β 1-AR) (préférentiels au niveau cardiaque). Ces molécules, utilisées pour certaines d'entre elles à des fins thérapeutiques en médecine humaine et vétérinaire en raison de leurs propriétés pharmacologiques, présentent parfois des effets zootechniques intéressants. C'est le développement d'agonistes spécifiques des récepteurs adrénergiques (β -AR), en particulier le clenbutérol, qui a conduit à envisager l'utilisation des β -agonistes en élevage pour leurs effets « d'agents de répartition », à savoir une diminution de la masse du tissu adipeux, associé à une accréation protéique⁽¹⁾. Ces propriétés anabolisantes ont été évaluées chez de nombreuses espèces animales, l'activité la plus forte ayant été

observée chez les ruminants (augmentation de la masse protéique produite, amélioration de la conformation des carcasses et de l'indice de consommation).

Genèse de l'approche

Si un contrôle performant de l'usage des β -agonistes peut être aujourd'hui assuré par le réseau des laboratoires officiels en Europe, la mise en évidence de certaines pratiques, notamment le recours par d'éventuels fraudeurs à de nouveaux composés synthétiques ou encore l'usage de cocktails basses doses, demeure un défi pour les scientifiques et une problématique toujours d'actualité pour les structures de contrôle. Le développement de nouvelles approches analytiques apparaît aujourd'hui nécessaire pour faire progresser l'efficacité du contrôle de l'utilisation de ces substances en élevage. Dans ce contexte, des stratégies dites « globales » ou « indirectes » sont mises en œuvre afin de mettre en évidence, non pas la molécule administrée, mais l'effet qu'elle produit sur l'animal. L'idée sous-jacente est d'identifier des biomarqueurs de pratiques anabolisantes. Ces stratégies globales réfèrent notamment aux approches « omiques » parmi lesquelles la métabolomique, qui à travers la génération d'empreintes métaboliques permet la mise en évidence de profils discriminants d'animaux traités versus non traités et la mise en lumière de biomarqueurs d'effet associés. Le développement de ces approches métabolomiques, basées le plus souvent sur la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse très haute résolution, constitue depuis une dizaine d'années une activité intense de recherche et de développement au sein du Laberca (laboratoire national de référence en la matière). De nombreux projets

(1) Accréation protéique ou gain protéique net: correspond à une synthèse protéique supérieure à la protéolyse

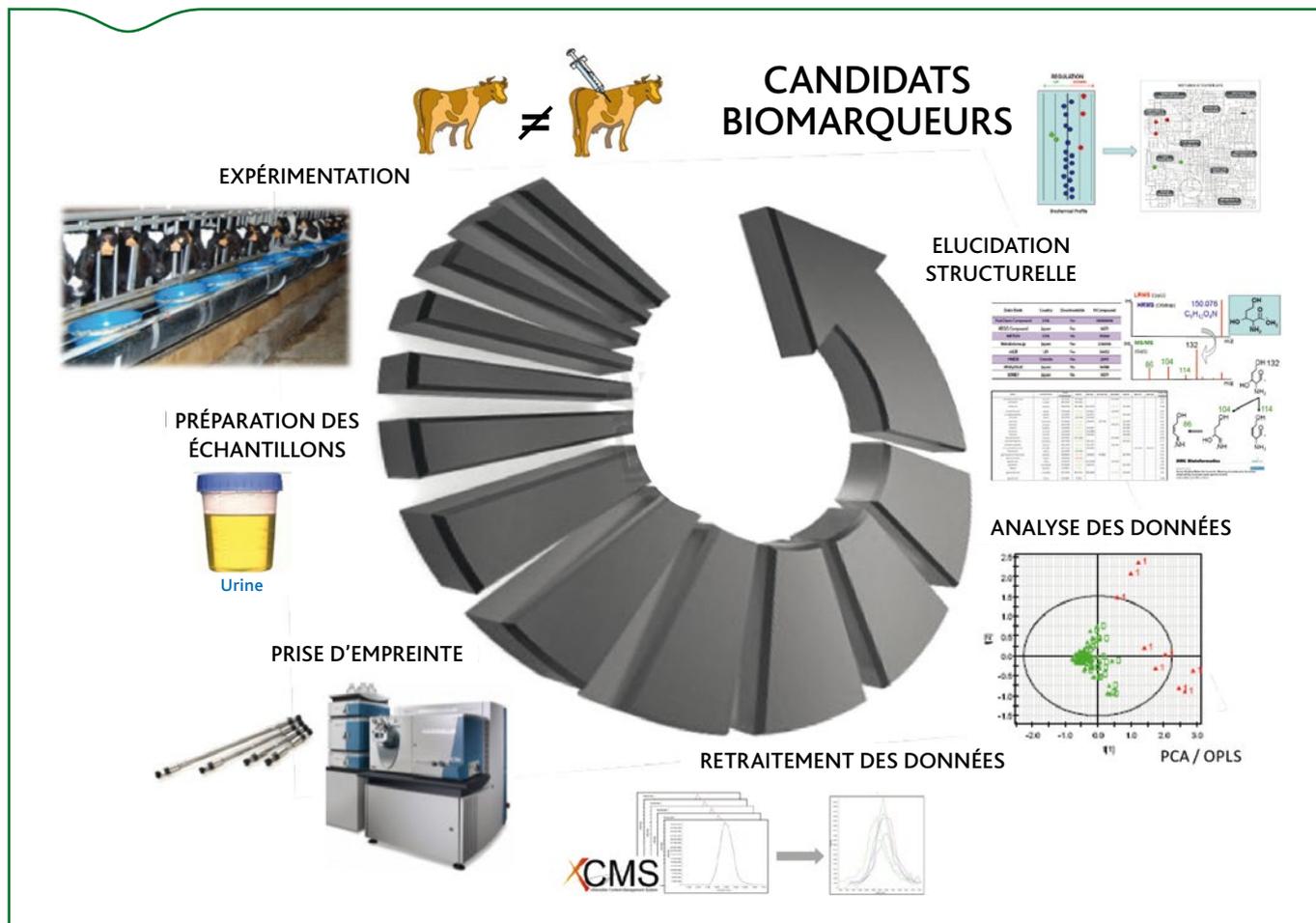


Figure 1. Processus analytiques conduisant à l'observation (ou pas) de marqueurs d'effets consécutifs à l'exposition d'un animal de production à une substance active (par ex. β -agoniste)

de recherche soutenus par la région Pays de la Loire, l'État (DGAL) et l'Union européenne (EU FP6, EU FP7, Projets Marie Curie) ont permis d'obtenir des résultats prometteurs autorisant aujourd'hui d'envisager l'utilisation officielle de biomarqueurs signant l'effet anabolisant chez des animaux de production.

Comment identifie-t-on ces biomarqueurs ?

Le processus conduisant à la détection et à l'identification de biomarqueurs d'exposition ou d'effet débute nécessairement par une expérimentation animale bien calibrée. La puissance statistique doit être raisonnablement ajustée de manière à donner de la robustesse aux signaux détectés dès les premières observations. La plus basique des expérimentations est conduite sur deux groupes d'animaux (le plus souvent veaux pour les β -agonistes), l'un étant considéré comme témoin, l'autre recevant l'administration de la substance (la posologie et la durée du traitement sont définies sur la base de conditions d'usage pré-supposées). Les deux groupes d'animaux doivent posséder des caractéristiques intrinsèques (races, âge...) et d'élevage (conditions physiques, alimentation, stress...) – à défaut d'identiques – les plus proches possibles de manière à ne pas entraîner de biais dans l'interprétation des observations, en raison d'un paramètre qui ne serait pas lié à l'administration de la molécule. Les fluides biologiques (sang et urine) des animaux sont prélevés de manière homogène entre individus avant et après administration à pas de temps réguliers. La conservation des échantillons doit être identique du début à la fin de l'expérimentation et entre animaux; une température de -80°C est requise pour prévenir la dégradation de composés labiles du métabolome. Le processus analytique débute par la préparation des échantillons en se plaçant dans les meilleures conditions de comparabilité (Figure 1). Une normalisation est fréquemment réalisée; pour illustration, une mesure

de la gravité spécifique de chaque échantillon permet par dilution de ramener tous les échantillons à la même valeur. Ensuite, puisque par principe une telle stratégie analytique ne s'appuie pas sur des *a priori* en termes d'analyse, l'échantillon est amené, lorsque possible, tel quel à l'analyseur. Une étape de filtration reste toutefois nécessaire pour éliminer les molécules à haut poids moléculaire (> 10000 Da). On considère qu'une vaste majorité des molécules caractérisées sous le vocable métabolome possède des masses moléculaires inférieures à 1000 Da. Deux types principaux d'enregistreurs sont utilisés par la communauté; d'une part la résonance magnétique nucléaire (RMN), d'autre part la spectrométrie de masse très haute résolution. La RMN ne donne en pratique accès qu'à une faible fraction du métabolome, limite due sa relative faible sensibilité (détection possible au-dessus de plusieurs dizaines de microgrammes).

La spectrométrie de masse en revanche produira des signaux interprétables jusqu'à quelques centaines de picogrammes, donnant ainsi accès à la plus grande partie du métabolome. N'importe quel spectromètre de masse ne peut pas produire ces empreintes métaboliques; seuls ceux opérant en très haute résolution (résolution $> 30,000$) pourront, par la spécificité du signal produit, donner une information sur la masse exacte des molécules donc leur formule brute. Les spectromètres de masse compétents pour cette opération sont essentiellement les temps de vol (TOF) et les orbitrapes; ils sont le plus souvent couplés à de la chromatographie en phase liquide ou gazeuse. Les empreintes chromato-spectrométriques produites pour chaque échantillon sont extrêmement riches en informations si bien que la comparaison des profils entre échantillons n'est possible que par l'usage d'outils chimio-métriques puissants et dédiés.

Une étape d'alignement et de normalisation des signaux précède l'usage des outils statistiques qui comprennent une analyse de variance (ANOVA), une analyse en composante principale (ACP), une Orthogonal Partial Least Squares (OPLS) ou une analyse par classification

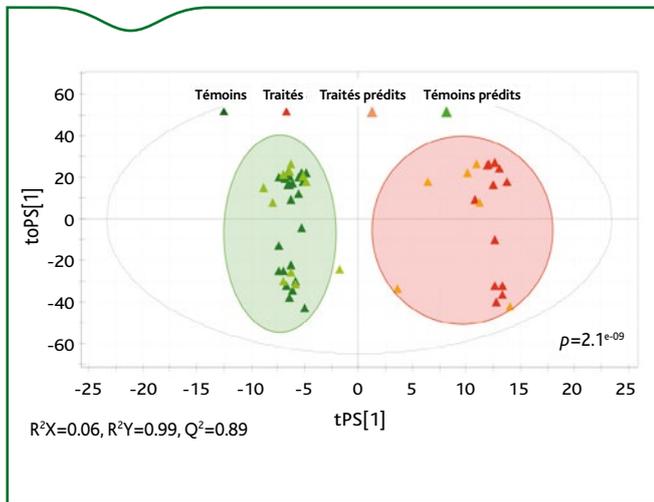


Figure 2. Analyse multivariée supervisée de type OPLS (Orthogonal Projections to Latent Structures) et représentation d'un jeu de données combinant animaux traités (en rouge ou orange) et témoins (verts clair et foncé)

Chaque point représente un animal. Une séparation significative des deux groupes d'animaux est observée sur ce graphique. La prédictivité d'appartenance à un groupe pour un échantillon collecté chez un animal traité (orange) versus non traité (vert clair) est assurée en atteste le positionnement des animaux considérés dans le modèle.

ascendante hiérarchique (CAH). Un exemple de représentation graphique est donné en Figure 2; l'OPLS sépare nettement les deux classes d'animaux traités versus non traités et prédit parfaitement l'appartenance d'animaux au statut connu dans le modèle. Chaque axe de l'analyse intègre une équation liant les marqueurs entre eux. Une représentation sous forme de S-plot permet de mieux visualiser les marqueurs responsables de la différence entre groupes (Figure 3). Chaque point (=une variable) sur ce graphique (par ex. M300T1063) correspond à une molécule. Les points aux extrémités du nuage représentent les molécules contribuant le plus à la différence observée, elles sont dès lors considérées comme marqueurs potentiels de l'effet. Les deux extrémités du nuage de points correspondent, d'un côté aux

signaux sur-exprimés chez les animaux traités, de l'autre à ceux sous-exprimés chez ces mêmes animaux traités. À ce stade du processus, des signaux, donc des candidats biomarqueurs, peuvent se dégager spécifiquement dans chacun des deux groupes d'animaux et expliquer la séparation entre groupes. Deux informations sont accessibles, le temps de rétention du marqueur et sa masse exacte.

L'identification de la structure développée, donc l'assignation d'un nom à la molécule, passe alors par des investigations additionnelles. Cette élucidation implique d'abord l'interrogation de bases de données; pour des molécules déjà décrites, l'identification peut être rapide. Pour des molécules qui ne le seraient pas, les étapes menant à la structure chimique de la molécule inconnue peuvent être beaucoup plus chronophages.

Comment valide-t-on ces biomarqueurs ?

La validation du caractère diagnostique des candidats biomarqueurs passe par la mesure du profil métabolique d'un grand nombre d'échantillons collectés chez des animaux non traités. La plus grande variabilité doit être introduite à ce niveau pour rendre robuste l'information délivrée par les biomarqueurs finalement retenus. Les caractéristiques des animaux recrutés doivent permettre de couvrir le plus grand nombre de situations en termes de race, âge, sexe, alimentation, variables de collecte (heure, saison...). Pour tester le caractère sélectif de la réponse donnée par les biomarqueurs, des urines collectées chez des animaux traités par des substances appartenant à d'autres classes pharmacologiques peuvent également être intégrées au modèle afin de vérifier que le profil des biomarqueurs d'intérêt n'est pas perturbé. Enfin, des échantillons d'urine issus d'autres expérimentations où les animaux auraient été traités par des β -agonistes de structure différente de celle utilisée dans l'expérimentation originelle permettent de tester le caractère universel des marqueurs d'effet, *i.e.* au regard de la réponse donnée pour des composés d'une même classe pharmacologique. La durée de détectabilité de la perturbation du profil des biomarqueurs suite à un traitement β -agoniste doit être déterminée pour préciser la performance diagnostique de l'approche.

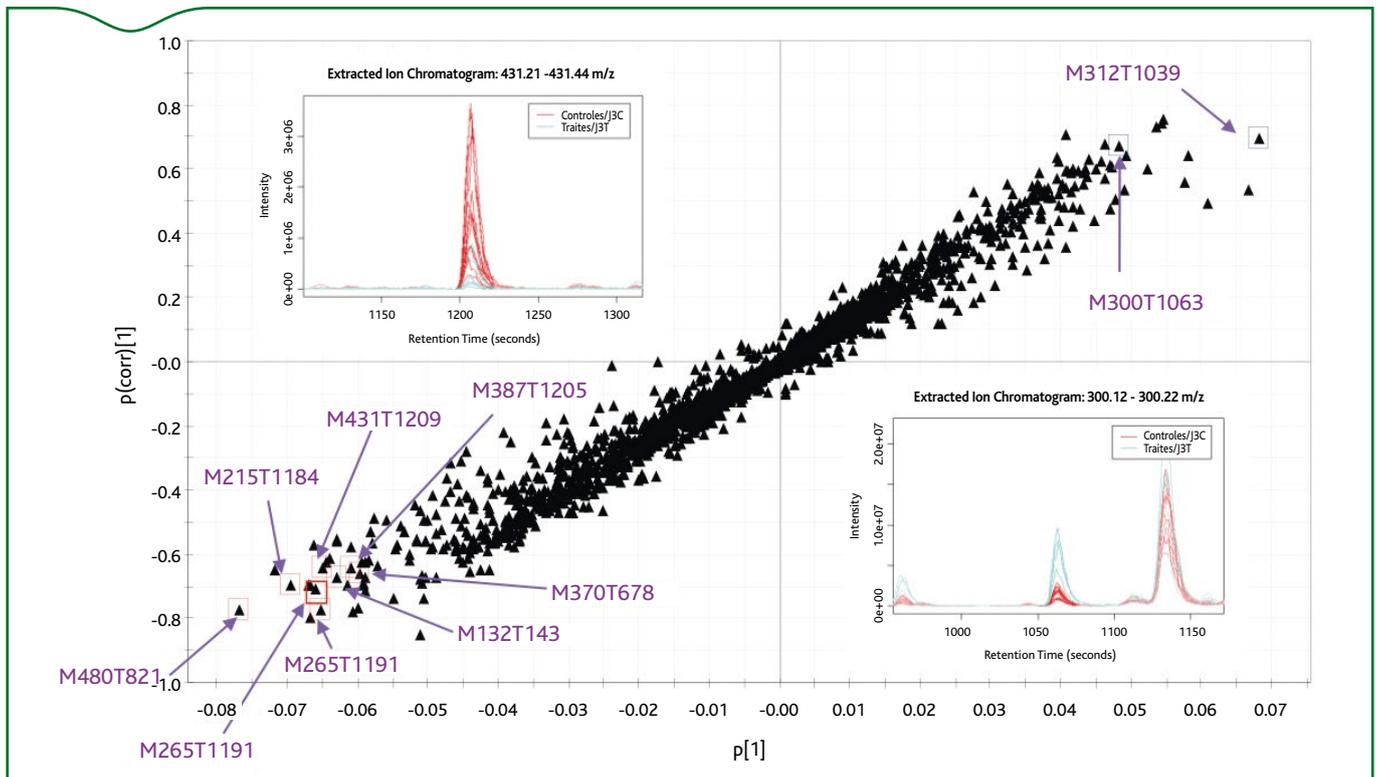


Figure 3. Représentation S-plot des molécules ayant contribué à la séparation des groupes témoins et traités

Chaque point (par ex. M300T1063) correspond à une molécule. Plus ces points sont proches des extrémités, plus ils contribuent à la séparation. Ils sont des marqueurs potentiels de l'effet. Dans le carré en haut à droite apparaissent des signaux sur exprimés chez les animaux traités; dans le carré en bas et gauche, les signaux sont plus exprimés chez les témoins.

Comment utilise-t-on ces biomarqueurs ?

Lorsque les biomarqueurs sont caractérisés partiellement ou totalement, deux stratégies sont possibles. La première repose sur le développement de test rapide, peu coûteux et facile à mettre en œuvre, utilisant des anticorps dirigés contre chacun des marqueurs. L'inconvénient de cette approche est qu'elle nécessite de connaître parfaitement les biomarqueurs pour pouvoir développer des anticorps spécifiques. La seconde stratégie est basée sur un couplage chromatographie – spectrométrie de masse en approche ciblée. Le principe de la dilution isotopique peut être utilisé pour garantir une bonne quantification individuelle de chacun des biomarqueurs et *in fine* une prédiction robuste pour l'échantillon testé. L'avantage principal est que la connaissance de la structure développée du marqueur n'est pas indispensable; l'inconvénient réside dans la mesure qui reste technique et réservée à des laboratoires spécialisés.

En cas de perturbation de l'homéostasie métabolique, *i.e.* une valeur pour y dans l'équation au-delà d'une valeur seuil traduisant la suspicion d'une non-conformité (Figure 4), une approche ciblée visant les β -agonistes connus est mise en œuvre. Si le résultat est en désaccord avec le test métabolomique de dépistage, la recherche de résidus d'un β -agoniste dont la structure chimique n'est pas encore connue est activée. Il s'agit alors d'une véritable opération de *fishing* qui peut nécessiter l'usage concomitant de tests biologiques (reconnaissance de la molécule par anticorps, cage chimique ou récepteur) et spectrométriques (identification de la structure chimique).

Conclusion

L'efficacité du modèle et sa pertinence à prédire des échantillons d'animaux traités avec différents β -agonistes - seuls ou en cocktails basses doses a été démontrée. La variabilité naturelle des profils métaboliques des animaux a été éprouvée sur plusieurs centaines d'individus confortant chaque jour un peu plus le modèle. Ce dernier présente dorénavant un pouvoir prédictif répondant aux exigences réglementaires en matière de méthode de dépistage, notamment au regard du taux cible de faux-suspects et faux conformes. Après un plan expérimental 2014 ayant permis de finaliser le modèle expérimental, le plan 2015 permettra de produire les premiers résultats officiels de dépistage. La spécificité du modèle et sa capacité à prédire d'autres types de traitements anabolisants chez les bovins (stéroïdes, GH...) sont également en cours d'investigation.

Références bibliographiques

- Antignac, J. P., Courant, F., Pinel, G., Bichon, E., Monteau, F., Elliott, C., et al. (2011). Mass spectrometry-based metabolomics applied to the chemical safety of food. *TrAC, Trends in Analytical Chemistry*, 30(2), 292–301. doi:10.1016/j.trac.2010.11.003.
- Courant, F., Pinel, G., Bichon, E., Monteau, F., Antignac, J. P., & Le Bizec, B. (2009). Development of a metabolomic approach based on liquid chromatography-high resolution mass spectrometry to screen for clenbuterol abuse in calves. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Analyst*, 134(8), 1637–1646. doi:10.1039/b901813a.
- Courant F, Antignac JP, Dervilly-Pinel G, Le Bizec B. Basics of mass spectrometry-based metabolomics. *Journal of Proteome Research* 2014;14:2369-2388.
- Dervilly-Pinel, G., Weigel, S., Lommen, A., Chereau, S., Rambaud, L., Essers, M., et al. (2011). Assessment of two complementary liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry metabolomics strategies for the screening of anabolic steroid treatment in calves. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Analytica Chimica Acta*, 700(1–2), 144–154. doi:10.1016/j.aca.2011.02.008.
- Dervilly-Pinel, G., Courant, F., Chereau, S., Royer, A., Boyard-Kieken, F., Antignac, J., et al. (2012). Metabolomics in food analysis: Application to the control of forbidden substances. *Drug Testing and Analysis*, 4, 10.
- Dervilly-Pinel G, Chereau S, Cesbron N, Monteau F, Le Bizec B. LC-HRMS based metabolomics screening model to detect various β -agonists treatments in bovines. *Metabolomics* 2015 (DOI 10.1007/s11306-014705-3).

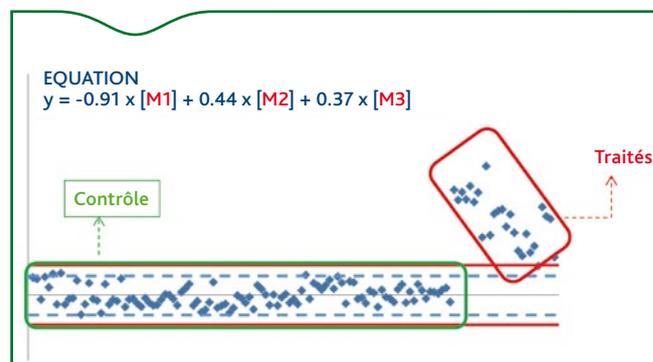


Figure 4. Mise en équation des biomarqueurs et utilisation en contrôle officiel

L'axe des ordonnées représente une équation liant les trois marqueurs retenus pour le test (M1, M2, M3), l'axe des abscisses correspondant aux différents animaux. Plusieurs centaines d'échantillons témoins ont permis de calculer pour ces trois marqueurs des valeurs moyennes mais aussi d'en déduire les valeurs des 95^e et 99^e percentiles, (P95 et P99, resp.) Au-delà de la valeur du P99, un échantillon est considéré suspect et doit faire l'objet de la procédure de confirmation.

Gallart-Ayala H., Chéreau S., Dervilly-Pinel G., Le Bizec B. Potential of mass spectrometry metabolomics for chemical food safety. *Bioanalysis Review*, 2015;7(1):133-146.

Jacob, C. C., Dervilly-Pinel, G., Biancotto, G., & Le Bizec, B. (2013). Evaluation of specific gravity as normalization strategy for cattle urinary metabolome analysis. *Metabolomics*. doi:10.1007/s11306-013-0604-z.

Jacob, C., Dervilly-Pinel, G., Biancotto, G., Monteau, F., & Le Bizec, B. (2014). Global urine fingerprinting by LC-ESI(?)–HRMS for better characterization of metabolic pathway disruption upon anabolic practices in bovine. *Metabolomics*. doi:10.1007/s11306-014-0685-3.

Kaabia, Z., Dervilly-Pinel, G., Popot, M. A., Bailly-Chouriberry, L., Plou, P., Bonnaire, Y., et al. (2014). Monitoring the endogenous steroid profile disruption in urine and blood upon nandrolone administration: an efficient and innovative strategy to screen for nandrolone abuse in horses. *Drug Testing and Analysis*. doi:10.1002/dta.1520.

Kieken, F., Pinel, G., Antignac, J., Garcia, P., Popot, M., Grall, M., et al. (2011). Development and application of a metabolomic approach based on liquid chromatography-high resolution mass spectrometry to reveal an illegal administration of recombinant equine growth hormone in horse from urinary and plasmatic biological signatures. *Metabolomics*, 7, 9.

Kouassi Nzoughe J, Dervilly-Pinel G, Chéreau S, Biancotto G, Monteau F, Elliott CT, Le Bizec B. First insights into serum metabolomics of Revalor-XS® implanted bovines; Screening model to predict animals' status. *Metabolomics* 2015.

Le Bizec, B., Pinel, G., & Antignac, J. P. (2009). Review: Options for veterinary drug analysis using mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216, 8016–8034.

Mooney, M. H., Bergwerff, A. A., van Meeuwen, J. A., Luppa, P. B., & Elliott, C. T. (2009). Biosensor-based detection of reduced sex hormone-binding globulin binding capacities in response to growth-promoter administrations. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Analytica Chimica Acta*, 637(1–2), 235–240. doi:10.1016/j.aca.2008.08.024.

Pinel, G., Weigel, S., Antignac, J. P., Mooney, M. H., Elliott, C., Nielsen, M. W. F., et al. (2010). Targeted and untargeted profiling of biological fluids to screen for anabolic practices in cattle. *TrAC, Trends in Analytical Chemistry*, 29(11), 1269–1280. doi:10.1016/j.trac.2010.06.010.

Pinel, G., Weigel, S., Lommen, A., Chéreau, S., Rambaud, L., Essers, M., et al. (2011). Assessment of two complementary LC-HRMS metabolomics strategies for the screening of anabolic steroid treatment in calves. *Analytica Chimica Acta*, 700, 10.