
Données d'occurrence associées des colorants dans les poissons d'élevage et perspectives de recherche

Les principes de la Loi Européenne sur l'alimentation (European Food Law), ainsi que ceux des règlements fixés aux Etats-Unis, au Canada ou encore au Japon, déterminent les principes fondamentaux de surveillance et de conditions d'importations, afin de préserver les ressources, notamment de produits de la mer, et de répondre aux fortes attentes des citoyens en matière de sécurité et de qualité de leurs aliments (Commission Européenne, 2020).

A ces fins, des **programmes de surveillance et d'inspection** des produits de la mer ont été mis en place dans le monde entier depuis plus de 20 ans afin de favoriser le libre-échange et les importations de façon fiable et sécuritaire. Ainsi, les organismes de réglementation et les administrations des pays importateurs sont responsables de l'inspection de la production nationale de poisson d'élevage et des produits aquacoles importés. La teneur en résidus de médicaments vétérinaires, mais aussi les contaminants tels que les métaux lourds, les polychlorobiphényles (PCB), les toxines et les agents pathogènes microbiens, de cette production et de ces importations est soigneusement contrôlée afin d'atténuer les expositions non intentionnelles chez l'homme, susceptibles de présenter des risques pour la santé.

Concernant les colorants, bien que le JECFA ait recommandé aux autorités compétentes du monde entier de ne pas les utiliser chez les animaux producteurs d'aliments, leur usage en aquaculture reste une réalité, probablement parce qu'ils sont toujours largement présents dans l'industrie textile et ailleurs, mais aussi encore disponibles dans le commerce de détail sous forme de produits chimiques thérapeutiques pour les poissons d'ornement. Dans ce cadre de recommandations et de Food Law, l'UE a exigé depuis les années 2000 que **ces substances soient activement contrôlées** dans les produits alimentaires destinés à la consommation humaine, et essentiellement ceux issus de l'élevage de poissons et de fruits de mer.

3.1 Une surveillance assurée au quotidien par les Plans Nationaux de Contrôle des Résidus (National Residue Monitoring Plans, NRMPs)

3.1.1 Obligations

Les pays membres de l'UE doivent mettre en œuvre des plans nationaux de surveillance et de contrôle des résidus chimiques chez les animaux producteurs d'aliments, en fonction de l'ampleur de leurs productions respectives ; et ce afin de détecter le mésusage de médicaments vétérinaires autorisés ou bien l'usage abusif et illégal de substances vétérinaires aujourd'hui interdites et de rechercher les raisons de la présence de ces résidus.

3.1.2 Importations hors UE

Les règles de l'UE affectent aussi ses partenaires commerciaux du monde entier. Les pays non membres de l'UE souhaitant exporter vers les pays de l'UE doivent garantir le même niveau de sécurité des denrées alimentaires et des aliments pour animaux que celui exigé dans l'UE. Aussi ces pays exportant vers l'UE doivent garantir la mise en œuvre d'un plan de surveillance des résidus de niveau équivalent.

3.1.3 Résultats des plans en 2015, 2016, 2017

Dans le cas des produits de l'aquaculture, un plan de surveillance des résidus, comprenant des analyses de résidus de médicaments vétérinaires, de pesticides, de métaux lourds et de contaminants environnementaux, doit être en place pour vérifier la conformité aux exigences de l'UE. Le plan et les résultats du suivi de l'année précédente doivent être soumis à la Commission Européenne chaque année pour approbation et la liste des pays avec les plans approuvés est répertoriée et révisée régulièrement. Si l'on extrait les données des trois derniers rapports publiés faisant état des résultats des plans (Commission Européenne, 2016-2018) demandés selon la Directive N° 96/23/CE pour le groupe B3e « Autres substances et contaminants environnementaux, colorants », les résultats des échantillons non conformes pour les résidus de colorants sont les suivants :

- En 2015, 43982 échantillons ont été analysés pour les substances du groupe B3 parmi lesquels **839 échantillons étaient non-conformes** (1.91 %). De même que pour le groupe B2, la fréquence des analyses pour certains sous-groupes B3 est très variable en fonction de la catégorie d'animaux et de produits. Alors que les contaminants chimiques (B3c) sont analysés dans toutes les catégories d'animaux et de produits, les colorants (B3e) ne sont analysés que dans les produits d'aquaculture, représentant un total de 1688 analyses spécifiques sur 27 états membres de l'UE concernés par l'élevage aquacole. Au total, 28 échantillons ont été signalés non-conformes (1.66 %) parmi les échantillons analysés pour les produits d'aquaculture. Les colorants retrouvés étaient principalement **MG, CV, et BG ainsi que leurs métabolites LMG, LCV**.
- En 2016, 36923 échantillons ont été analysés pour les substances du groupe B3 parmi lesquels **659 échantillons étaient non-conformes** (1.78 %). La prévalence en colorants (B3e) dans les échantillons de l'aquaculture (1.57 %) se trouvaient dans le même intervalle que les 9 années précédentes (1.14 %–2.2 %). Le nombre d'échantillons non-conformes sur les 1651 analyses spécifiques pour les colorants étaient de 26 (1.57 %). Les colorants retrouvés étaient **MG, et CV ainsi que leurs métabolites LMG et LCV**.
- En 2017, 40809 échantillons ont été analysés pour les substances du groupe B3 parmi lesquels **601 échantillons étaient non-conformes** (1.47 %). Les résidus de colorants (groupe B3e) ont été rapportés en aquaculture pour 28 échantillons non-conformes (1.79 %) sur les 1567 analyses pour ce groupe. Les colorants retrouvés étaient **MG, et CV ainsi que leurs métabolites LMG et LCV**.

3.2 Un système européen d'alerte rapide: RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed)

3.2.1 Inspection des produits de la pêche aux frontières de l'UE (Postes d'Inspection Frontaliers, PIFs)

Les importations de produits de la pêche en provenance de pays non membres de l'UE doivent entrer dans l'UE via un des nombreux postes d'inspection frontalière (PIF) agréé et placé sous l'autorité d'un vétérinaire officiel dans l'État membre de l'UE en question. Par conséquent, les contrôles des produits de la mer importés dans l'Union doivent être effectués par un PIF avant que les produits ne pénètrent sur le territoire européen. La fréquence et le type des contrôles physiques sont déterminés pour chaque catégorie de produits sur la base du risque intrinsèque et des résultats des contrôles effectués précédemment sur le même produit de même origine.

S'il s'avère que l'envoi est en non-conformité avec la législation de l'UE, pour une raison quelconque, les PIFs notifient alors la non-conformité à l'ensemble de leurs collègues de l'UE par le biais **du système de notification interne, RASFF**.

3.2.2 Les alertes RASFF

Le système d'alerte rapide pour les denrées alimentaires et les aliments pour animaux (RASFF) a été mis en place afin de fournir aux autorités de contrôle des denrées alimentaires et des aliments pour animaux, un outil efficace pour échanger des informations sur les mesures prises pour faire face aux risques graves détectés concernant les denrées alimentaires et les aliments pour animaux. Cet échange d'informations aide les pays de l'UE à agir plus rapidement et de manière coordonnée face à une menace pour la santé publique résultant de l'alimentation humaine ou animale. Les membres du RASFF ont chacun un point de contact national désigné qui est chargé de transférer les notifications du RASFF vers la Commission Européenne et les autres Etats Membres. Avant la notification d'alerte, tout un processus a été appliqué entre le laboratoire, l'autorité compétente et le point de contact national. Le détail des notifications d'alertes est répertorié dans un portail dédié (Commission Européenne, RASFF portal), où l'on peut trouver un ensemble de détails pour chaque dossier et les niveaux de risques associés à chaque alerte (risque élevé, faible, non décidé).

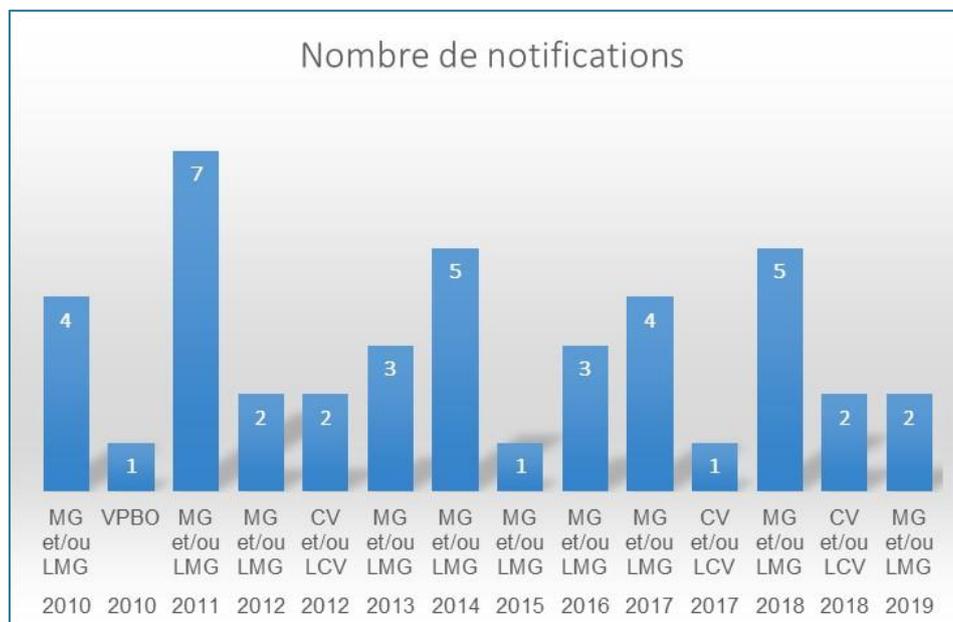


Figure 21 : Nombre d'alertes recensées en Europe pour les colorants dans les produits d'aquaculture extraites du portail EU RASFF entre 2010 et 2019

Pour les colorants, le nombre d’alertes recensées depuis 2010 et extraites du portail est représenté sur la **Figure 21** et ces alertes sont détaillées dans le **Tableau 9** (espèce, origine, quantité exprimée en concentration). Le nombre de notifications a oscillé entre 1 et 5, voire exceptionnellement 7 en 2011. Elles concernent d’abord le couple MG/LMG, puis CV/LCV, et enfin une seule alerte a concerné le VPBO en 2010. Environ la moitié des notifications ont ciblé des espèces provenant d’Asie du sud-est comme le poisson *Panga* du Vietnam. Les autres espèces aquacoles provenaient aussi d’Europe de l’Est comme la truite ou la carpe.

Tableau 9 : Notifications recensées en Europe pour les colorants dans les produits d’aquaculture extraites du portail EU RASFF entre 2010 et 2019

<i>Année</i>	Colorant	Espèce-origine	Quantité en ppb
2010	MG	Truite Allemagne	3.3
	LMG	Tilapia Chine	20
	LMG	Crevette Thaïlande	3.3
	MG	Poisson Panga Vietnam	/
	VPBO	Poisson Panga Vietnam	8.9
2011	MG+LMG	Poisson Chat Vietnam	1.6
	LMG	Gambas Inde	22.4
	LMG	Truite Pologne	1.08
	LMG	Truite Autriche	1.24
	LMG	Poisson Chat Vietnam	6.2
	LMG	Caviar Chine	4.39
2012	LMG	Œufs Truite Danemark	2.5
	LMG	Truite Allemagne	62.4
	LMG	Truite Turquie	3.48
	LCV	Poisson Chat Indonésie	/
	CV	Truite Slovaquie	3.75
2013	MG+LMG	Carpe Pologne	9.21-243.78
	MG	Poisson Chat Vietnam	9.21
	LMG	Truite Pologne	6.66
2014	MG+LMG	Red-tail Tinfoil Barb Vietnam	/
	MG	Poisson Goby Vietnam	6.26
	MG	Red-tail Tinfoil Barb Vietnam	4.6
	MG+LMG	Poisson Chat Vietnam	0.9
	LMG	Perche Vietnam	18.9
2015	LMG	Poisson congelé Vietnam	39
2016	LMG	Truite Danemark	4.96
	LMG	Truite Danemark	5.9
	MG+LMG	Crevette Bangladesh	1.6-0.91
2017	LMG	Carpe Lituanie	2.4
	LMG	Poisson Chat Vietnam	> MRPL
	LMG	Poisson Chat Vietnam	/
	MG	Poisson Chat Vietnam	29
	LCV	Truite Allemagne	6.2

2018	LMG	Poisson Chat Vietnam	40.44
	MG+LMG	Barramundi Vietnam	2-54
	LMG	Truite Allemagne	10
	LMG	Truite République Tchèque	7.73
	LMG	Carpe Biélorussie	0.42
	CV	Poisson Panga Vietnam	> CC α
	CV	Poisson Panga (peau) Vietnam	0.8
2019	LMG	Truite Italie	13.4
	LMG	Poisson Chat Vietnam	40.44

3.2.3 Les données d'études scientifiques confortent ces résultats

Les résultats annuels des NRMPs (1.5 % d'échantillons non-conformes) et des RASFF des 28 Etats Membres de l'UE démontrent que, malgré leur interdiction, les colorants, et surtout MG, restent utilisés frauduleusement. Cette occurrence pourrait être liée parfois à une cause environnementale (rejets d'industries par exemple). Il est à noter que les méthodes d'analyse en Europe ne couvrent pas tous les colorants dans leur périmètre, et que la recherche analytique presque centrée seulement sur MG pourrait biaiser les résultats. Mais CV, également recherché par certaines des méthodes d'analyse concernant les colorants (15 états membres le recherchent), serait beaucoup moins fréquent dans les produits aquacoles. Plusieurs études scientifiques (liste non exhaustive) sont recensées ci-dessous depuis 2010 (**Figure 22**), et corroborent ces résultats :

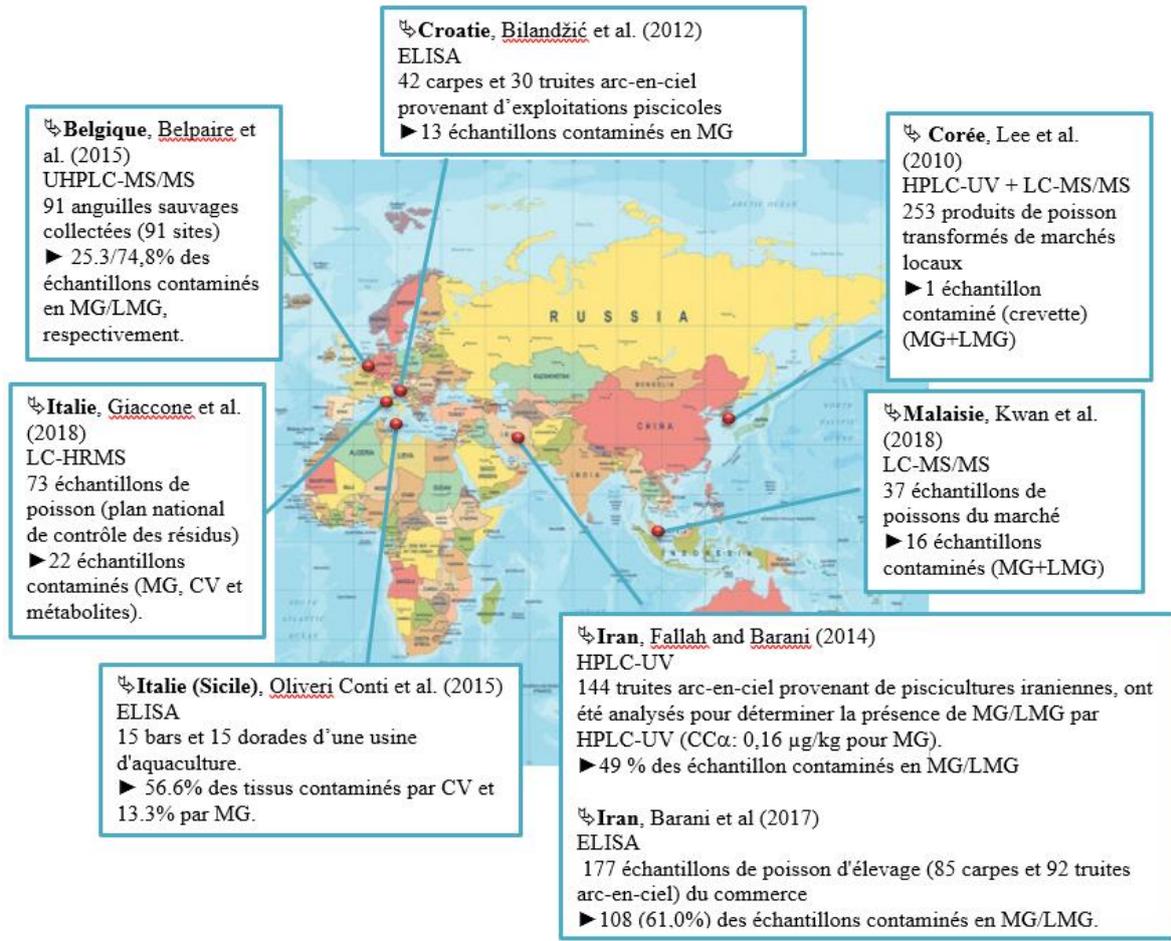


Figure 22 : Etudes scientifiques de recherche de colorants dans les produits d'aquaculture

- Lee et al. (Lee et al., 2010) ont présenté une analyse de 253 produits de poisson transformés provenant des marchés locaux en **Corée** (année d'échantillonnage non indiquée). Les échantillons ont été analysés par HPLC-UV (LOQ: 1,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$) et les résultats positifs ont été confirmés par LC-MS/MS. Des résidus de MG/LMG ont été détectés dans un échantillon de crevette à une concentration de 2,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$.
- Des échantillons de carpes (n = 42) et de truites arc-en-ciel (n = 30), prélevés entre 2009 et 2011 dans des exploitations piscicoles en **Croatie**, ont été analysés pour déterminer les résidus de MG, à l'aide d'un test ELISA spécifique à MG (CC β : 0,68 $\mu\text{g}/\text{kg}$). MG a été détecté dans 13 échantillons, mais à des concentrations inférieures à la MRPL de 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Bilandžić et al., 2012).
- Oliveri Conti et al. (Oliveri Conti et al., 2015) ont analysé des échantillons de bar (n = 15) et de dorade (n = 15) prélevés dans une usine d'aquaculture en **Italie** en 2013. Une méthode ELISA avec une LOD de 0,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a été utilisée. MG a été détecté à des concentrations allant jusqu'à 1,21 $\mu\text{g}/\text{kg}$ et CV jusqu'à 3.79 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dans 13.3 % et 56.6 % des échantillons.

- Des échantillons d'anguilles européennes sauvages ont été collectés entre 2000 et 2009 en **Belgique** (n = 91 sites; 1 anguille / site) pour une étude d'occurrence environnementale. Les échantillons ont été analysés par UHPLC-MS/MS (LOD : 0,05 µg/kg). MG/LMG ont été détectés dans 25.3/74,8 % des échantillons, respectivement. Des concentrations allant jusqu'à 0,96/9.61 µg/kg ont été rapportées pour MG et LMG, respectivement (Belpaire et al., 2015).
- Des échantillons (n = 144) de truites arc-en-ciel, collectés en 2011 dans des piscicultures iraniennes, ont été analysés pour déterminer la présence de MG/LMG par HPLC-UV (CC α : 0,16 µg/kg pour MG). Des résidus de MG (somme de MG + LMG) ont été détectés dans 49 % des échantillons à des concentrations comprises entre 0,3 et 146,1 µg/kg (Fallah and Barani, 2014). De nouveau, une étude plus récente de Barani et al (Barani and Tajik, 2017), a examiné la présence de résidus de MG dans 177 échantillons de poisson d'élevage (85 carpes et 92 truites arc-en-ciel) achetés dans le nord-ouest de l'**Iran** de 2014 à 2015. La méthode d'immuno-essai enzymatique (CC β <1 µg/kg), a identifié la présence de MG dans 108 échantillons de poisson, ce qui correspond à 61,0 % du total des échantillons examinés, compris entre 0,35 et 7,12 µg/kg. Les résultats ont indiqué que l'utilisation de MG dans les piscicultures iraniennes est fréquente.
- Des échantillons (n = 37) de divers poissons en **Malaisie** achetés sur 11 marchés différents, ont été analysés pour déterminer la présence de MG/LMG par LC-MS/MS. Les résultats ont montré que la somme des résidus de MG et de LMG dans la présente étude allait de 0,53 à 4,1 µg/kg et présents dans 16 échantillons sur 37 (42 %), le résidu le plus élevé étant détecté dans le poisson-chat domestique rayé (Kwan et al., 2018).
- Giaccone et al. (Giaccone et al., 2018) ont étudié la présence de MG, LMG, BG, CV et LCV par LC-HRMS dans la chair du poisson. Une limite de décision CC α comprise entre 0,55 et 0,62 µg/kg a été estimée. La méthode a été utilisée avec succès pour détecter les résidus de colorant dans 73 échantillons de poisson, comme prévu dans le plan national de contrôle des résidus. Soixante-treize échantillons, y compris de la truite et du bar, ont été achetés auprès de différents marchés et d'éleveurs en **Italie**. Vingt-deux de ces échantillons ont été trouvés contaminés par des colorants en quantité supérieure à CC α . La présence de MG et de CV dans tous les échantillons positifs a été mise en évidence, avec des concentrations plus faibles de leurs leuco métabolites.

3.2.4 Conclusions et perspectives de recherche

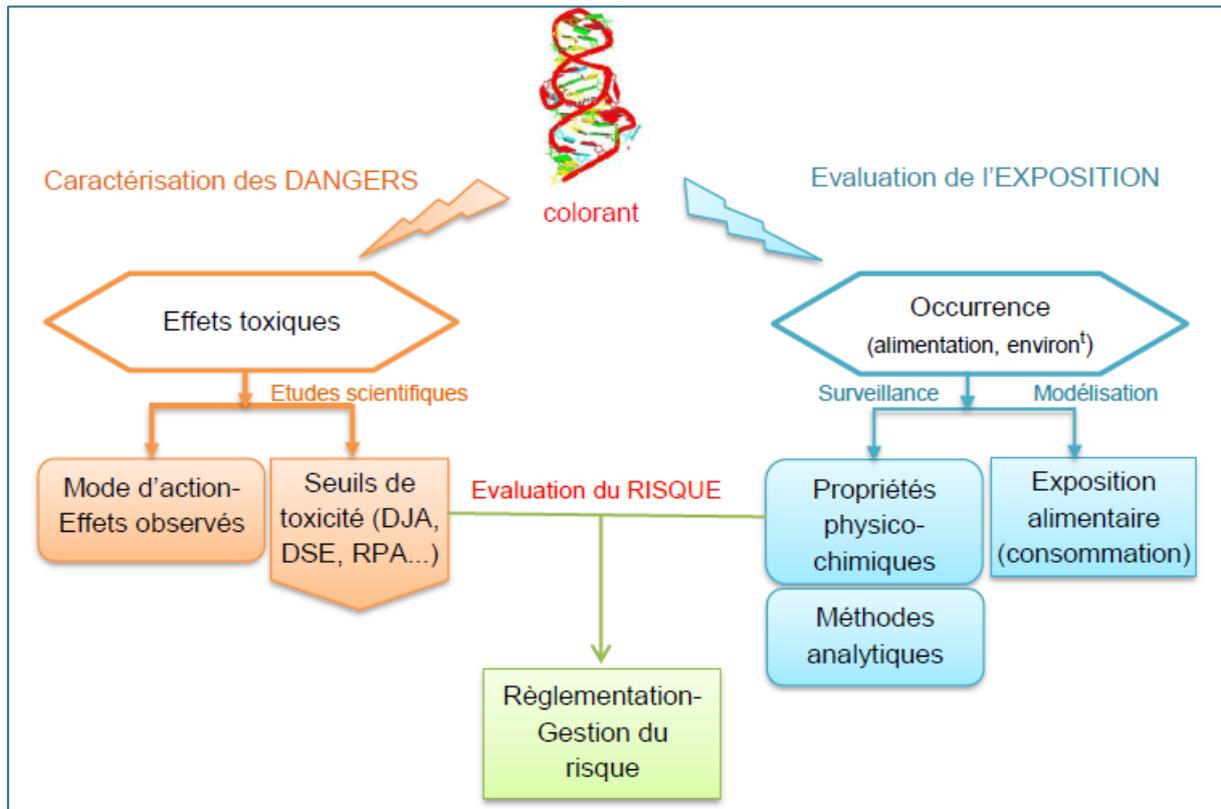


Figure 23 : Diagramme simplifié d'évaluation des risques pour une substance comme les colorants

L'objectif ultime d'une évaluation de risques est de s'assurer de la sécurité sanitaire. Elle permet de faire évoluer la réglementation en émettant des règles de gestion des risques (Figure 23). Cette évaluation se prépare en associant la caractérisation des dangers à l'évaluation de l'exposition. Le paradigme d'analyse des risques a d'ailleurs été défini par le Codex Alimentarius comme un procédé comportant trois composantes : l'évaluation du risque, la gestion du risque et la communication du risque. Dans l'analyse des risques, la séparation fonctionnelle entre les évaluateurs et les gestionnaires des risques est décrite comme essentielle pour assurer l'objectivité scientifique du processus d'évaluation des risques.

Nous nous sommes axés dans cette thèse sur des travaux méthodologiques, visant à rechercher des résidus marqueurs endogènes et exogènes de poissons contaminés par les colorants. Comme nous l'avons vu dans cette synthèse bibliographique, la **caractérisation des dangers** issus de l'utilisation des colorants en aquaculture est relativement bien décrite. La toxicité, les modes d'action et les seuils de toxicité ont fait l'objet de nombreuses études, surtout pour MG et CV, mais des rapprochements entre structures sont souvent réalisés pour les autres colorants. Ainsi certaines études éparses, sur les substances de la famille des Victoria par exemple, démontrent

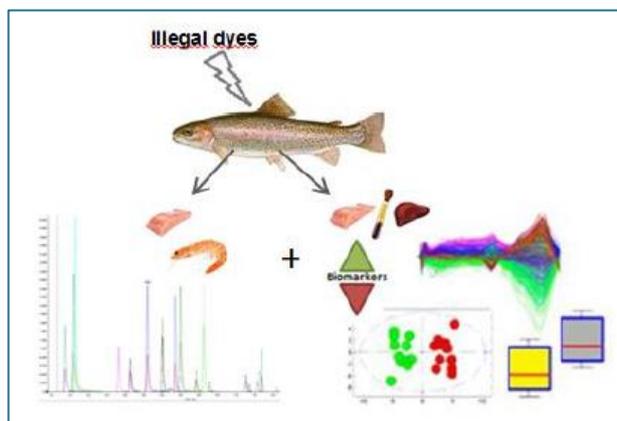
que d'autres colorants structurellement proches s'avèrent également être des dangers potentiels. Dans le rapport de l'EFSA sur MG (EFSA et al., 2017a), les experts ont rappelé que :

- Des données concernant la présence de métabolites supplémentaires dans les poissons et les crustacés devraient être générées.
- Des informations supplémentaires sur le devenir de MG et de LMG au cours de la transformation des aliments devraient être obtenues.
- Les connaissances concernant la toxicocinétique et la biodisponibilité de MG / LMG chez l'homme par des modèles *in vitro* devraient être renforcées.
- Les informations concernant la génotoxicité potentielle des métabolites N-déméthylés devraient être développées.
- Les adduits de l'ADN et du GSH observés chez les rongeurs doivent être caractérisés.

Ces conclusions démontrent que, même pour MG qui est le colorant le mieux caractérisé à ce jour, des données complémentaires seraient nécessaires pour renforcer l'évaluation de risque. Il serait intéressant en particulier de renforcer les connaissances sur l'occurrence de métabolites et leur toxicité dans les produits contaminés. Malgré un contrôle important déployé dans le monde entier au cours des 15 dernières années, MG est toujours utilisé comme le montrent les données d'occurrence. MG reste donc l'un des premiers problèmes à résoudre en matière de contrôle des résidus de colorants en aquaculture dans le monde, mais il est également nécessaire d'anticiper sur les pratiques en élevage et par conséquent sur les méthodes analytiques permettant leur contrôle.

D'une part, la contamination d'un lot de poisson par le VPBO qui démontre une adaptation des pratiques interdites en réponse à la réglementation, d'autre part les métabolites des colorants qui ne sont pas assez pris en compte dans l'évaluation des risques, et enfin l'idée que l'expansion de l'aquaculture doit pouvoir répondre à la demande mondiale en protéines, sont trois aspects d'une problématique commune à laquelle nous devrions répondre. Après avoir traité les points sur les caractéristiques physico-chimiques des colorants et de leurs résidus, leur surveillance réglementaire dans les denrées alimentaires et leur occurrence en terme d'exposition en aquaculture, le chapitre bibliographique suivant traitera de l'intérêt des études de métabolisme pour orienter les méthodes analytiques du futur en vue de répondre à une caractérisation plus précise des dangers auxquels les consommateurs sont exposés.

4 La métabolomique comme outil pour l'évolution des méthodes d'analyses : recherche de biomarqueurs de traitement



Ces 20 dernières années, le besoin d'analyses rapides, sensibles, et précises des molécules telles que les médicaments et leurs métabolites dans les matrices biologiques complexes ont conduit à une amélioration continue des technologies de séparation et de détection physico-chimique de type CL/SM. La science du métabolisme et la

spectrométrie de masse ont été combiné de façon avec succès pour l'étude du vivant et cela grâce à la mise au point d'instruments analytiques modernes extrêmement sensibles, à la disponibilité de bases de données sur les métabolites et aux progrès de la (bio)-informatique (Want et al., 2007).

En analyse physico-chimique pour la surveillance des contaminants et médicaments vétérinaires, les substances et métabolites d'intérêt correspondants ont d'abord été suivis dans les matrices biologiques à l'aide de méthodologies simples et ciblées. Cependant, dans certains cas, ces approches ciblées ne permettaient pas la détection de certains composés, comme par exemple de nouvelles substances anabolisantes interdites issues de l'émergence de nouvelles pratiques en élevage (Gallart-Ayala et al., 2015). Les scientifiques ont ainsi progressivement pu ouvrir les yeux afin de scruter les êtres vivants, les problématiques, les processus, les mécanismes d'action. Cette nouvelle logique initiée en génomique a contribué au développement de nouvelles approches OMICS, qui incluent la **métabolomique**. Cette ouverture sur l'ensemble des métabolites fabriqués par un système vivant a pu se réaliser grâce à l'apparition et au développement des technologies non-ciblées, qui ont su contribuer positivement au domaine de la sécurité des aliments.

4.1 Le métabolome, définition et principe

Dans son rapport « Using 21st Century Science to Improve Risk-Related Evaluations », l'académie des sciences a défini la métabolomique comme étant : « *L'étude scientifique des petites molécules (métabolites) de produits chimiques originaires d'un système biologique vivant (de manière endogène) ou extérieur à ce système biologique (de manière exogène)* » (National Academies of Sciences and Medicine, 2017). Elle est représentée dans la dernière étape de la cascade « omics » (**Figure 24**) faisant suite aux modifications expressionnelles génomiques et transcriptomiques (expression des gènes et leur régulation), puis protéomiques (analyse des protéines générées suite à la régulation génique).

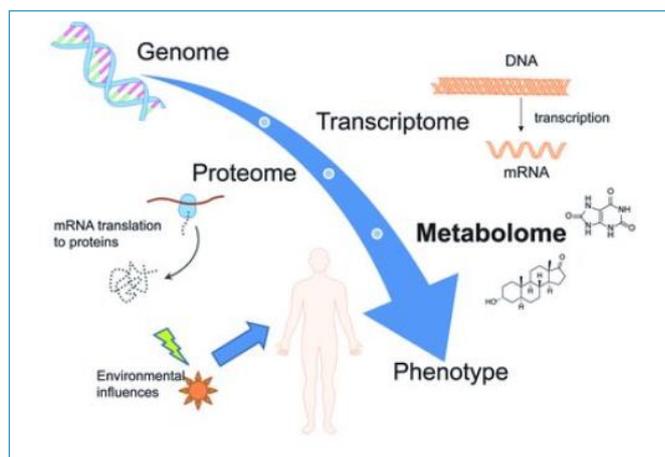


Figure 24 : Représentation schématique des différentes sciences « omics ». Source: (Steuer et al., 2019)

Le terme **métabolome** est apparu pour la première fois dans une étude de séquençage du génome de la levure en 1998 (Oliver et al., 1998). Plus précisément, le métabolome représente l'ensemble des substances métaboliques de faible poids moléculaire (<1 kDa) contenues dans un système biologique tels que des cellules, des fluides biologiques (urine, plasma et sang), les tissus ou encore les organismes vivants. Ces métabolites interagissent au sein du système biologique étudié dans des conditions génétiques, nutritionnelles et environnementales données. Ils peuvent être classés selon leur origine, endogène ou exogène à l'organisme (Want et al., 2007). À cet égard, la métabolomique est une source exceptionnelle de découverte de biomarqueurs, qui présente des avantages par rapport aux autres approches omiques (Ryan and Robards, 2006).

↳ L'endo-métabolome

Parmi les métabolites endogènes, représentant l'**endo-métabolome**, on distingue les métabolites primaires, directement impliqués dans les processus indispensables au développement normal et à la reproduction des cellules, et les métabolites secondaires qui sont spécifiques aux plantes. Ces métabolites appartiennent à différentes familles chimiques telles que les acides aminés, les acides carboxyliques, les alcools, les antioxydants, les nucléotides, les polyols ou encore des vitamines.

↳ Le xéno-métabolome

Le concept de xéno-métabolome a été défini au début des années 2000 comme étant « la description multivariée du profil du métabolite xénobiotique (composé étranger) d'un individu ou d'un échantillon provenant d'un individu qui a été exposé par différentes voies possibles (délibérément ou accidentellement) à des médicaments, des polluants environnementaux ou des composants alimentaires qui ne peuvent pas être complètement catabolisés par des systèmes enzymatiques métaboliques endogènes » (Holmes et al, 2007).

↳ La métabolomique en sécurité des aliments

La métabolomique s'applique à des domaines variés, comme la médecine personnalisée en chimie clinique (Mayr, 2008), la pharmacologie, la toxicologie, afin de relier une **exposition chimique** (mesure des substances chimiques parentes ou de leurs produits directs de biotransformation/dégradation) à un **effet biologique** (mesure de biomarqueurs indirects dont le niveau d'expression est sur- ou sous-exprimé consécutivement à cette exposition).

L'application de la métabolomique dans les systèmes alimentaires est appelée «**métabolomique alimentaire**», représentée schématiquement sur la **Figure 25**. Elle peut s'appliquer à tous les processus des systèmes alimentaires (Josic et al., 2017), de la ferme à l'homme, y compris la production de ressources alimentaires, la transformation industrielle de produits alimentaires et la consommation alimentaire par l'homme (Kim et al., 2016).

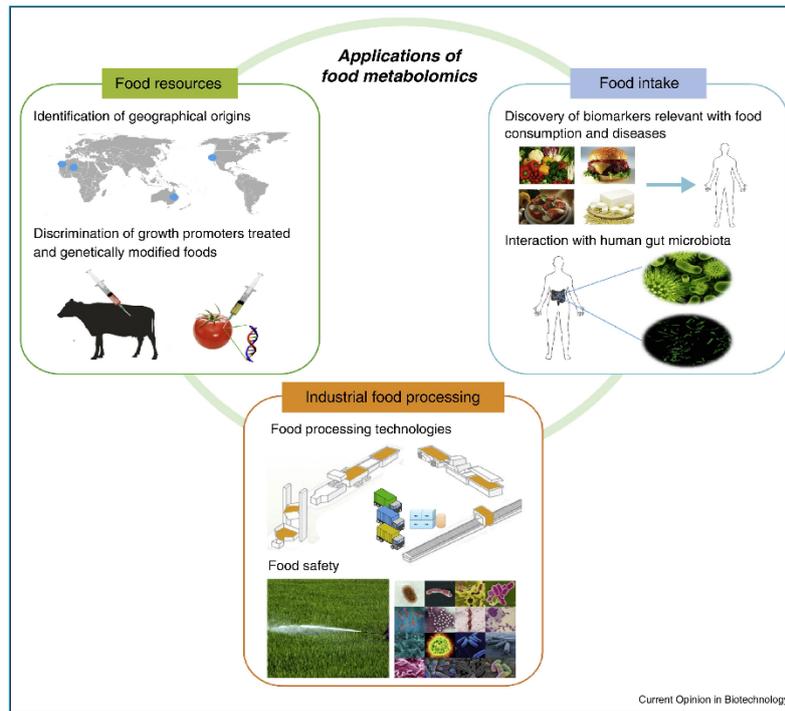


Figure 25 : Les trois principales applications de la métabolomique alimentaire, de la ferme à l'homme: la production de ressources alimentaires, la transformation industrielle des aliments et la consommation alimentaire par l'homme. Source : (Kim et al., 2016)

Le métabolome alimentaire est défini comme la partie du métabolome humain directement issue de la digestion et de la biotransformation des aliments et de leurs constituants. Ces aliments peuvent ainsi être modifiés par l'ingestion de contaminants et/ou **contenir leurs résidus comme ceux issus de médicaments administrés en production animale**, et sont donc évalués et contrôlés afin de s'assurer qu'ils ne présentent pas de dangers pour les consommateurs (sécurité sanitaire des aliments).

↳ La métabolomique en sécurité chimique des aliments d'origine animale

Les applications de la métabolomique en sécurité chimique des aliments se diversifient de plus en plus, afin d'observer les perturbations physiologiques induites, notamment pour les applications liées à la détection d'utilisations illicites de facteurs de croissances à faibles concentrations ou en mélanges pour l'élevage d'animaux (bêta-agonistes, stéroïdes, thyrostatiques) ou à la présence de contaminants (dioxine, HAP, PCB...). Le **Tableau 10** recense les applications en sécurité chimique des aliments d'origine animale et certaines applications d'éco-toxicologie chez le poisson.

Tableau 10 : Etudes métabolomiques réalisées en LC-HRMS dans le domaine de sécurité chimique des aliments d'origine animale.

<i>Molécule</i>	<i>Espèce</i>	<i>Matrice</i>	<i>Instrumentation</i>	<i>Référence</i>
<i>Elevage</i>				
<i>Cocktail stéroïdes</i>	bovin	urine	LC-Orbitrap-MS, XCMS UPLC-ToF-MS, MetAlign	(Dervilly-Pinel et al., 2011)
<i>amoxicillin, cephapirin, ceftiofur</i>	poulet	muscle	LC-Q-TOF-MS	(Hermo et al., 2013)
<i>cimaterol, zilpaterol, ractopamine, clenbuterol, mabuterol</i>	bovin	urine	LC-Orbitrap-MS	(Dervilly-Pinel et al., 2015)
<i>Revalor-XS® trenbolone acetate- estradiol</i>	bovin	sérum	LC-Orbitrap-MS	(Kouassi Nzougnet et al., 2015)
<i>Clenbuterol, salbutamol, ractopamine</i>	porc	urine	LC-Q-TOF-MS	(Wu et al., 2015)
<i>Enrofloxacin</i>	bovin	lait	LC-Orbitrap-MS	(Junza et al., 2016)
<i>Ractopamine</i>	porc	sérum	LC-Orbitrap-MS	(Peng et al., 2017)
<i>Boldénone + cocktail stéroïdes</i>	bovin	urine	LC-Orbitrap-MS	(Kaabia et al., 2018)
<i>Cefquinome Ceftiofur</i>	Poule pondeuse	oeuf foie fiente	LC-Orbitrap-MS	(Gaugain et al., 2019)
<i>Poisson (éco-toxicologie/sécurité des aliments)</i>				
<i>Bisphénol A</i>	<i>Méné à tête de boule</i>	Mucus de la peau	LC-MS/MS	(Ekman et al., 2015)
<i>Contaminants chimiques, de rejets d'effluents après traitement des eaux usées</i>	<i>Gardon</i>	Plasma, gonades, rein, branchies, foie	nUHPLC-nESI-TOFMS	(David et al., 2017)
<i>UV filter oxybenzone</i>	Daurade juvénile	Cerveau, foie, plasma	UHPLC-Orbitrap-MS	(Ziarrusta et al., 2018)
<i>Rivière associée au développement des sables bitumineux</i>	Meunier noir	muscle	LC-MS/MS	(Roszkowska et al., 2019)

Chez le poisson, la métabolomique est très utile pour étudier la qualité de la chair en fonction du type d'alimentation administrée en aquaculture (Guan et al., 2018; Parsons et al., 2018; Zhao et al., 2018), ou encore pour étudier les effets de la consommation de poissons sur notre métabolisme (Rodrigues et al., 2018; Serra-Majem et al., 2019; Shi et al., 2019). Capello et al ont par exemple évalué les risques de consommation de thon rouge de l'Atlantique au regard de la sécurité des aliments mise en doute à cause des niveaux d'accumulation en PCBs et en pesticides organochlorés au niveau hépatique. Ils ont appliqué une approche métabolomique basée sur la technique de ^1H -RMN (Cappello et al., 2018). Les études d'éco-toxicologie utilisant la métabolomique et mises en œuvre chez le poisson (**Tableau 10**), souvent réalisées par profilage, permettent d'étudier l'impact des polluants sur leur organisme et peuvent de ce fait être corrélées avec les questions de sécurité des aliments dans le sens où l'homme sera le dernier maillon de la chaîne alimentaire.

↳ Les différents types d'approches en métabolomique

Dans ce domaine spécifique de la sécurité chimique des aliments étudié par des approches métabolomiques, une des difficultés repose sur la génération d'un grand nombre de signaux qui doivent refléter soit la présence éventuelle de résidus chimiques exogènes, dans notre étude ils sont issus d'un traitement d'une molécule de colorant interdite, soit la présence de métabolites transformés par les processus d'absorption, de distribution, de régulation et de métabolisme cellulaire. Ainsi, l'acquisition des signaux générés permet d'établir un lien entre les différences de fonctionnement biologique observées à l'état normal et à l'état perturbé. Apparaît alors une variation du taux de certains métabolites, qui seront sous-exprimés ou sur-exprimés. Cet ensemble de variations significatives devient représentatif d'un traitement s'il s'avère être suffisamment prédictif. Le ou les métabolites retenus peuvent alors accéder au statut de « **biomarqueur** » capable de dépister un traitement. Les **biomarqueurs d'exposition (cause) et d'effet** ont fait l'objet d'une définition précise par l'OMS (World Health and International Programme on Chemical, 1993). Ils traduisent les étapes successives allant 1/ d'une exposition à une dose interne, 2/ d'une dose interne à une dose biologiquement efficace (biomarqueur d'exposition = cause), et 3/ d'un effet biologique précoce à l'altération d'une structure ou d'une fonction (biomarqueurs d'effets). Un des principaux avantages de la métabolomique est donc d'appréhender les perturbations biologiques liées à une exposition chimique, alors que les modifications du génome et du protéome sont souvent très faibles et indétectables.

Aujourd'hui, le choix des techniques analytiques d'exploration du métabolome couvre deux stratégies, reposant sur le stade auquel l'identification des métabolites est effectuée (Dunn and Ellis, 2005), à savoir « (i) le **profilage** » et « (ii) l'**approche non ciblée ou globale** » :

- (i) En profilage, l'approche est ciblée, ou peut être également non ciblée si l'identité des métabolites n'est pas connue. L'idée est de suivre des métabolites spécifiques (exogènes) ou des perturbations le long d'une voie métabolique (endogènes). En mode ciblé, l'identification formelle des molécules permet d'utiliser un standard connu afin d'accéder à une quantification.
- (ii) La détermination d'empreinte métabolomique (approche non ciblée) examine l'instantané global de l'ensemble des métabolites présents dans l'échantillon sans nécessité d'identification ou de quantification, pour des échantillons présentant différentes conditions biologiques (ex : échantillons traités et échantillons témoins) ; elle est alors généralement suivie de l'application de méthodes statistiques pour tenter d'identifier les métabolites présentant des différences significatives de niveaux de concentration entre les échantillons étudiés. Cette approche a été appliquée à une large variété de matrices biologiques comme l'urine, le plasma, la salive, les milieux cellulaires.

Nous verrons, dans le chapitre suivant, que des méthodologies pluridisciplinaires et bien précises sont mises en œuvre lors de ces approches, notamment pour ce qui concerne les outils d'analyse chimique et chimiométrique, pour la recherche de métabolites endogènes et exogènes. Dans le cadre de cette étude sur les colorants, les deux approches ont été appliquées, une approche globale et une approche de profilage en partie ciblée.

4.2 La métabolomique non ciblée pour l'étude de l'endo-métabolome

Une approche métabolomique non-ciblée ou globale comprend plusieurs étapes avec pour but d'étudier la variabilité entre des groupes d'animaux traités et des groupes d'animaux non traités, dans notre cas des poissons. Plus la variabilité liée au processus de traitement des poissons sera maîtrisée et plus les variations biologiques seront visibles et permettront de distinguer de potentiels marqueurs pertinents. L'acquisition des empreintes chimiques en HRMS fournira un ensemble de données qui seront retraitées et exploitées au moyen d'outils d'analyses statistiques dans le but d'observer ces différences.

Les étapes principales de cette approche, schématisées ci-dessous (**Figure 26**) sont : la préparation des échantillons, la production et l'acquisition des signaux (données brutes), le traitement des données générées incluant leur annotation et éventuellement l'identification des métabolites ou biomarqueurs, et enfin si nécessaire l'interprétation biologique des biomarqueurs identifiés.

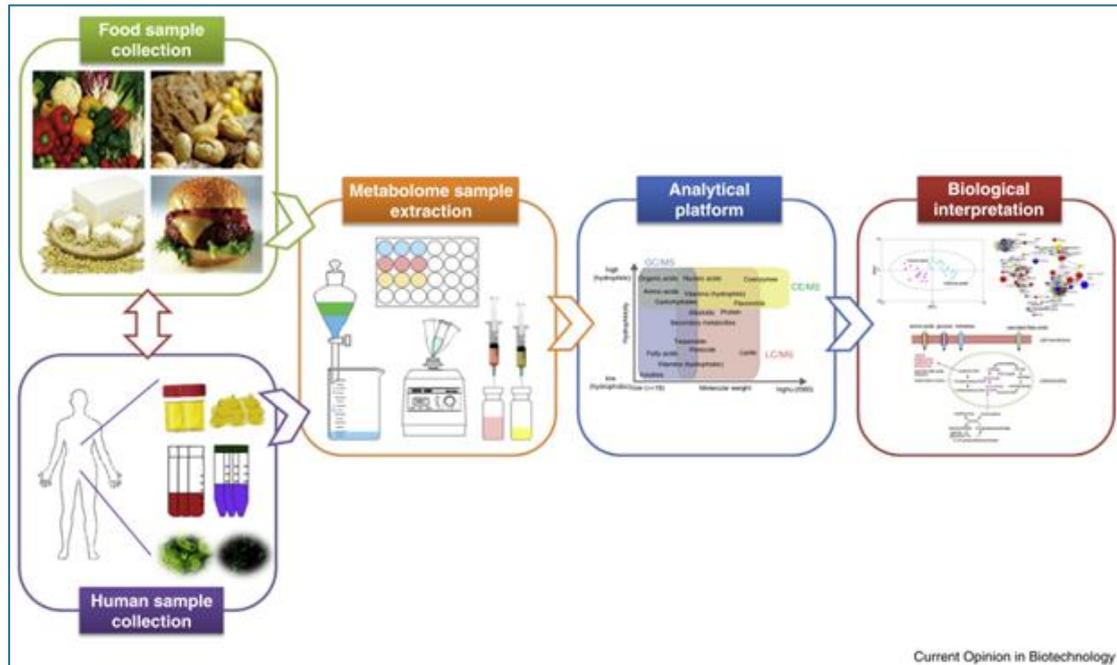
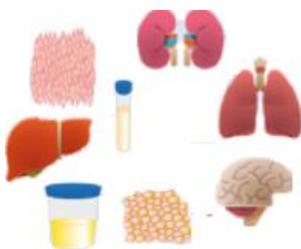


Figure 26 : Le workflow de la métabolomique alimentaire. Il comprend la collecte d'échantillons alimentaires et humains, l'extraction d'échantillons de métabolomes, l'analyse instrumentale à l'aide d'outils analytiques et l'analyse statistique de données métaboliques et leur interprétation biologique. Source : (Kim et al., 2016).

4.2.1 Workflow pré-analytique

↳ Collecte des échantillons



Avant de se lancer dans une analyse métabolomique, le choix du plan expérimental de la phase animale est primordial, afin de répondre à la question biologique souhaitée, qui est dans notre cas de repérer des différences biologiques entre des poissons traités aux colorants et des poissons non traités. Ce design est nécessaire pour garantir que même les plus petites variations biologiquement pertinentes du métabolome puissent être mesurées avec précision et que ces variations soient significativement plus importantes que les modifications ou perturbations introduites lors de la réalisation de l'étude (Gika et al., 2016). La qualité des données générées à partir d'une expérience de profilage est donc un résultat direct de la **qualité du plan expérimental** (Engskog et al., 2016).

Pour exemple concernant les poissons d'élevage, les paramètres physico-chimiques des bassins doivent être parfaitement maîtrisés et suivis, tels que la température de l'eau, le pH, le taux d'oxygène, l'absence de nitrates, le flux d'eau ; ainsi que les caractéristiques physiques des poissons tels que l'espèce et l'origine, le sexe, la taille, leur nourriture (Danion et al., 2012).

Ensuite, la réflexion se porte sur **la nature des échantillons biologiques** qui seront appropriés à l'étude, de même que l'attention portée aux prélèvements et au stockage est primordiale. Les tissus, les biofluides (sang, urine, fèces, liquide séminal, salive, bile, liquide céphalo-rachidien) et la culture cellulaire sont souvent cités et notamment l'urine et le plasma comme fluides biologiques couramment utilisés, car ils sont relativement faciles à obtenir et sont collectés de manière relativement non invasive. Les fèces, sont également souvent prélevés chez les animaux, comme chez les bovins par exemple, à condition de trouver des conditions d'extraction adaptées (Cesbron et al., 2017). Les échantillons moins courants à étudier comprennent le liquide céphalo-rachidien, la salive et le sperme, ainsi que divers échantillons de tissus. Les échantillons de tissus, à la différence des fluides biologiques, peuvent être utilisés pour quantifier les empreintes métaboliques spécifiques à un organe, ce qui permet d'étudier les origines des métabolites. Ils reflètent souvent mieux les changements métaboliques au sein de l'hôte. Ces échantillons présentent par contre l'inconvénient de devoir sacrifier les animaux, nécessitant alors une optimisation économe du nombre d'animaux pour l'expérimentation (Stella et al., 2017).

Chez les poissons, les branchies (Wen et al., 2018) et le mucus (Reverter et al., 2017) sont des matrices atypiques apportant des informations d'intérêt. Un échantillonnage soigneux, la préparation et la gestion des échantillons comme le stockage (souvent réalisé à -80°C), sont essentiels pour une analyse optimale.

↳ Extraction

L'étape d'extraction consiste à préparer les échantillons de la façon la plus simple possible en vue de limiter toute source de variabilité externe et surtout récupérer un maximum d'information. Cette étape dépend de plusieurs aspects tels que la nature de l'échantillon et l'approche envisagée. Les différents tissus retenus pour l'étude doivent être d'abord prélevés de façon à éviter les inter-contaminations. Par exemple, dans le cas du poisson, le prélèvement de sang peut conduire à une contamination de la peau.

Ensuite, différentes méthodes d'extraction sont utilisées pour optimiser la récupération des composés de caractéristiques physico-chimiques variées et qui diffèrent aussi bien au niveau de

leur taille, de la nature de leurs groupements fonctionnels, de leur volatilité, de leur polarité ou encore de leurs concentrations physiologiques. A ce jour, il n'existe donc pas de méthode analytique universelle, capable de s'intéresser à l'ensemble de ces molécules. Ces stratégies de pré-traitement plus ou moins ciblées peuvent inclure : ultrafiltration, précipitation des protéines, extraction par partage liquide-liquide, extraction par SPE, dérivation chimique, et évaporation suivie de la reconstitution en solution dans un solvant ou mélange de solvants approprié pour l'analyse. Pour les études métabolomiques non ciblées, l'échantillon biologique subit généralement un prétraitement minimal afin de prévenir la perte potentielle de métabolites. Les étapes de pré-traitement des échantillons peuvent être assez simples, séparant par exemple les composés de faible poids moléculaire des protéines et/ou des lipides en utilisant des techniques d'élimination de ces derniers. Des mélanges de solvants de polarité différentes, méthanol et acétonitrile pour les métabolites polaires, ou dichlorométhane et chloroforme pour les métabolites apolaires sont souvent utilisés. Par exemple, Fu et al ont utilisé un mélange acétonitrile:isopropanol:eau (3:3:2, v/v/v) pour extraire des composés endogènes chez des embryons de zebrafish à la suite d'un traitement au triclosan, et ont réussi à identifier 8 métabolites significativement altérés (urée, acide citrique, D-(+)-galactose, D-glucose, acide stéarique, L-proline, phénylalanine, acide L-glutamic) (Fu et al., 2019). Pour l'extraction de métabolites dans les biofluides, on utilise donc souvent des méthodes de prétraitement non sélectives, telles que la technique « dilute and shoot » et la précipitation de protéines par solvant, dans la mesure où elles permettent une couverture étendue des métabolites et des analyses à haut débit (Vuckovic, 2012; Raterink et al., 2014).

↳ Génération de données par LC-HRMS

Le choix de la méthode la plus appropriée pour la production des données en métabolomique va dépendre des molécules étudiées, des voies métaboliques d'intérêt, du matériel disponible et doit reposer sur un compromis entre la robustesse, la sélectivité et la sensibilité instrumentale (**Figure 27**), en particulier pour la recherche de composés exogènes qui parfois se trouvent masqués par le signal prépondérant de composés endogènes.

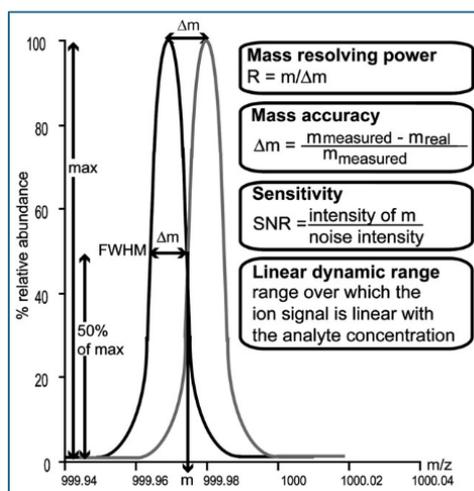


Figure 27 : Paramètres utilisés pour décrire les performances d'un système de spectrométrie de masse. Source : (Moco et al., 2007).

Les techniques de séparation chromatographique couplées à la spectrométrie de masse, notamment la LC-MS, la GC-MS, se sont révélées très utiles pour générer des données de métabolomique. Mais les métabolites doivent alors généralement être séparés du liquide biologique avant leur détection par le spectromètre, ce qui rend ces méthodes plus lentes et plus complexes que par exemple la spectroscopie par RMN. Cependant, elles offrent une sensibilité beaucoup plus élevée et permettent donc de mesurer quantitativement un plus large spectre de métabolites (Miggliels et al., 2019).

Tableau 11: Récapitulatif des performances (résolution, exactitude en masse) des différents analyseurs de spectrométrie de masse.

Analyseur	Résolution FWHM (m/z 400) De l'ordre de :	Exactitude en masse (ppm)
Quadripôle	3000	200
Piège à ions (2D/3D)	5000	200
Temps de vol	8000-60000	2-10 ^a
Orbitrap	100 000	<3
Résonance cyclotronique (FT-ICR)	10 000 000 ^b	<1

^a En utilisant un calibrant interne ; ^b Selon la puissance du champ magnétique

Concernant la partie séparation chromatographique, la génération de chaînes de type UHPLC ces 15 dernières années a participé au développement des recherches en métabolomique, par une séparation des métabolites améliorée, une diminution du phénomène de suppression d'ion, un signal sur bruit et une capacité résolutive des pics accrue, et un temps d'analyse plus court (Want et al., 2007). La tendance actuelle à la miniaturisation des techniques de séparation tend

à aller vers des débits encore plus réduits, compatibles avec des sources spectrométriques de type microspray et nanospray ou même de remplacer la séparation chromatographique par des techniques d'introduction directe dans la source permettant d'accroître l'efficacité d'ionisation des sources électrospray (ESI). En termes d'analyseurs à haute résolution HRMS, il existe de grandes variations de performances dans l'instrumentation entre les analyseurs à temps de vol (TOF) et les spectromètres de masse à transformée de Fourier (FTMS) basés sur des analyseurs de masse à trappe orbitale (Hardman and Makarov, 2003; Hu et al., 2005) ou à résonance cyclotronique ionique (ICR) (**Tableau 11**). Rathalao-Paris et al détaillent le panel d'instruments HRMS (pouvoir de résolution en masse supérieur à 10 000) utilisés en métabolomique en particulier pour leur avantage dans l'identification structurale des métabolites (Rathalao-Paris et al., 2016). La technologie Orbitrap™, utilisée dans le cadre de cette thèse, présente de multiples avantages (Senyuva et al., 2015; Ghaste et al., 2016):

- Une résolution de masse élevée avec la possibilité de discriminer les métabolites avec une erreur de masse de l'ordre de 1 à 3 ppm, ce qui permet d'analyser un extrait métabolique complexe et de minimiser également l'ambiguïté des attributions de formules moléculaires.
- Une flexibilité dans le choix de la source d'ions ou de la technique de fragmentation.
- Une capacité à effectuer plusieurs étapes de fragmentation (MSⁿ), utile pour une caractérisation accrue des métabolites de composés inconnus.

Les données brutes, par exemple acquises avec un LC-HRMS-Orbitrap, vont consister pour chaque échantillon en une série de pics caractérisés chacun par un **couple m/z-TR avec une intensité donnée** (représentation 3D). L'étape d'extraction des signaux est déterminante pour la suite de l'analyse des données. Elle va permettre de générer une base de données brutes à épurer en fonction du bruit de fond, d'artefacts et de la redondance dans les données. C'est pourquoi, la constitution de la série d'injections, c'est-à-dire l'ordre dans lequel les échantillons seront injectés, constitue également un paramètre à maîtriser. Ces échantillons devront être injectés de façon aléatoire (López-Ruiz et al., 2019), en intercalant des contrôles qualités (QC) nécessaires pour ré-aligner les pics chromatographiques dérivant légèrement en temps de rétention (TR), mais aussi en rapport masse-sur-charge (m/z).

4.2.2 Analyse et traitement de données

La quantité et la complexité des données produites par une seule expérience de métabolomique, notamment par l'acquisition en Full scan (balayage complet) de spectres MS, nécessitent des outils automatisés pour le prétraitement, l'analyse statistique et l'extraction d'informations biologiques utiles. C'est d'ailleurs aussi pour ces raisons de « Big Data » générées que le plan d'expérience (nombre d'animaux, conditions expérimentales, prélèvements ...) doit être optimisé. Lors de cette étude, une plate-forme dédiée regroupant un ensemble d'outils statistiques et chimiométriques pour chaque étape du traitement des données a été utilisée. Il s'agit de la plate-forme Galaxy « Workflow4metabolomics » (Giacomoni et al., 2015) et du package XCMS du logiciel RStudio. Les données brutes sont alors décomposées et traitées (les dimensions «m/z», «intensité» et «temps de rétention», le cas échéant, sont combinées pour produire ce que l'on appelle des « features » ou caractéristiques). Ces logiciels disposent d'algorithmes mathématiques permettant d'assurer ces étapes de pré-traitement des données par une détection automatique et un alignement des signaux. Une fois ces données éclaircies, le pré-traitement est ensuite suivi du traitement statistique des données. La recherche de signaux discriminants est réalisée en comparant les empreintes des échantillons regroupés en clusters pour mettre en évidence leurs similarités ou leurs différences. Un modèle statistique est construit en appliquant un traitement de données non supervisé (ACP) et/ou supervisé (PLS). La méthodologie est longue à détailler de façon exhaustive, et comme les modèles statistiques n'ont pas été appliqués personnellement (excepté le tri des « features » ou caractéristiques, et l'annotation des signaux), elle sera simplement schématisée et résumée ci-dessous (Castillo et al., 2011; Antonelli et al., 2019; Chaleckis et al., 2019) (**Figure 28**).

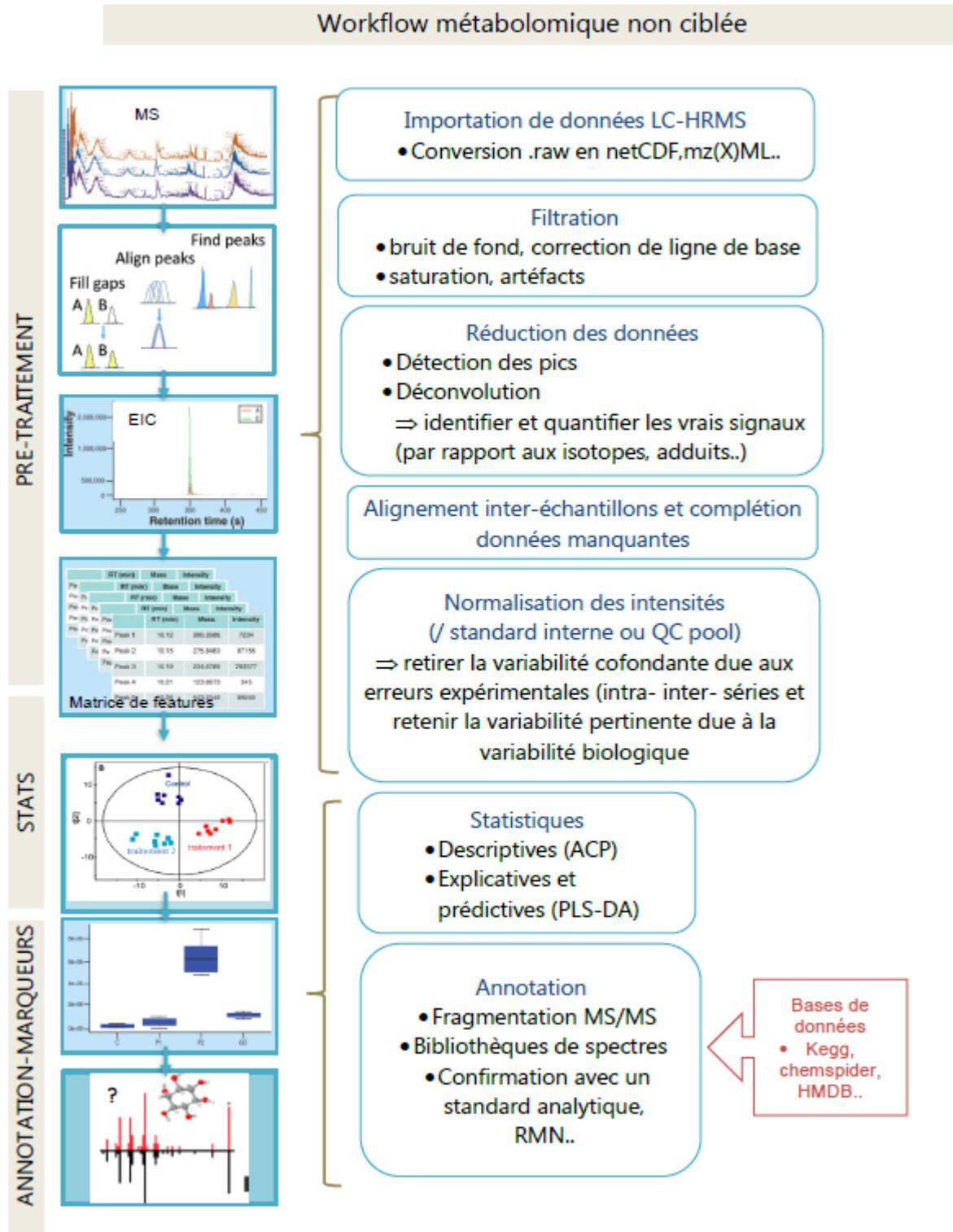


Figure 28 : Représentation du traitement de données d'une analyse métabolomique non ciblée. Source : modifié de (Gallard-Ayala et al., 2015).

Une fois le ou les signaux de potentiels marqueurs identifiés comme significativement modifiés biologiquement, un long chemin reste à parcourir jusqu'à leur identification formelle, appelée « annotation ». Le workflow suivi pour l'annotation de composés inconnus aboutit toujours à la consultation de bases de données proposant alors souvent plusieurs formules chimiques corrélées à la masse exacte du composé détecté et dont le niveau de correspondance est fonction de l'erreur de masse fixée par l'analyste (normalement inférieure à 5 ppm). Une fois qu'une formule a été sélectionnée, si le spectre expérimental MS/MS est aussi fourni, il peut être comparé avec les spectres théoriques fournis dans les banques de données. Mais l'attribution d'une identité sans équivoque ne pourra se faire qu'à l'aide du regroupement de différentes caractéristiques (masse exacte, schéma de fragmentation, profil isotopique) et de paramètres expérimentaux supplémentaires (par exemple, le temps de rétention et les spectres UV/VIS ou RMN). Enfin, il faudra confirmer les hypothèses avancées par comparaison avec les composés standards de ces molécules analysés dans les mêmes conditions. De plus, toute information biochimique, bibliographique, ainsi que toute autre information pertinente, doivent être prises en compte dans l'annotation du composé (Moco et al., 2007).

4.3 Profilage de métabolites exogènes à l'aide d'études *in vitro* et *in vivo*

L'approche par profilage des métabolites exogènes est différente de l'approche globale non ciblée présentée précédemment dans le sens où un *a priori* existe quant à la connaissance des réactions du métabolisme. Même si l'acquisition de tous les signaux est choisie (mode full scan HRMS), leur traitement peut s'appliquer sans les outils chimiométriques, à partir d'une méthodologie semi-ciblée. Les échantillons générés simulant le métabolisme proviennent de méthodologies *in vitro* ou *in vivo*. L'intérêt pour les méthodes *in vitro* s'est considérablement accru ces dernières années pour des raisons économiques, pratiques et éthiques. L'utilisation de lignées cellulaires comme alternatives aux tests *in vivo* est de toute façon indispensable en particulier dans l'évaluation des risques sanitaires des produits chimiques, seuls ou en mélange, étant donné le nombre considérable de substances chimiques à tester. La démarche méthodologique *in vitro* pour un profilage de métabolites exogènes est présentée ci-dessous (**Figure 29**).

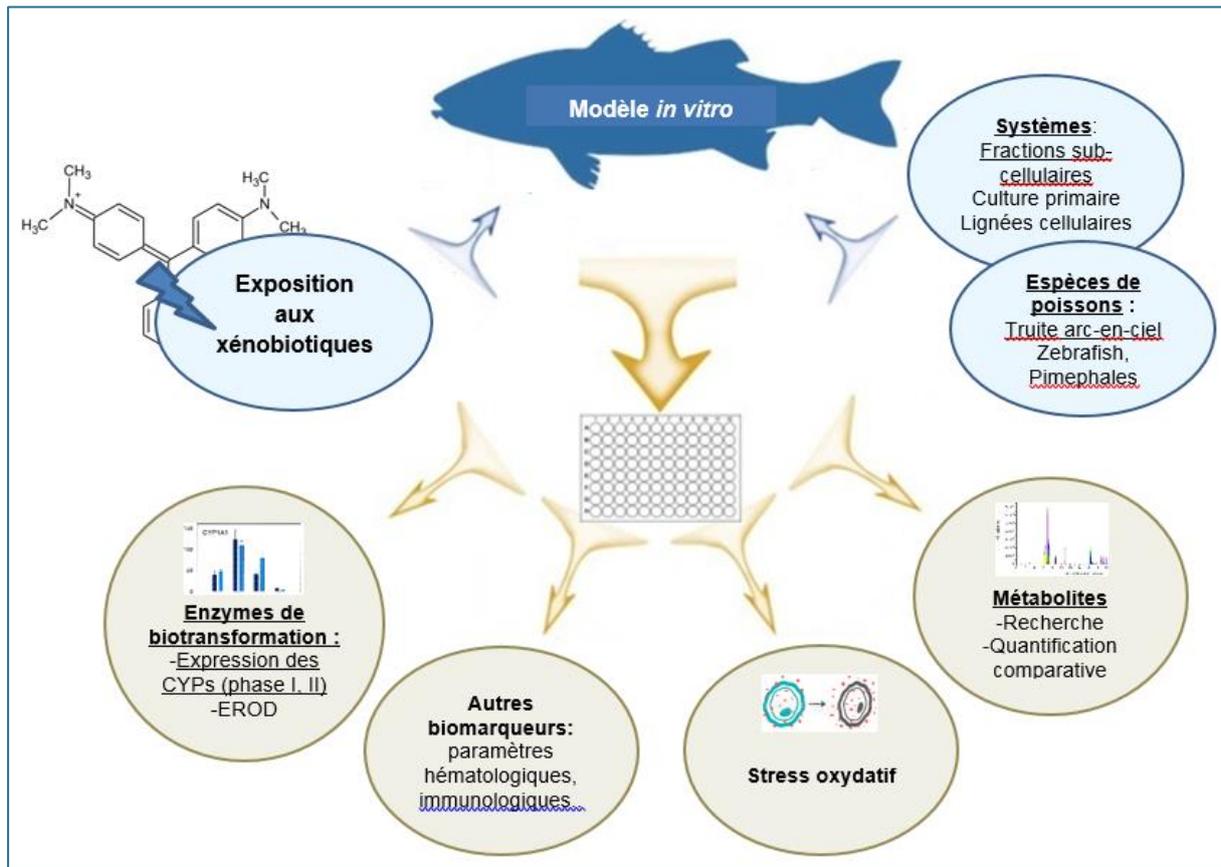


Figure 29 : Schéma conceptuel de la conception d'un modèle *in vitro* chez le poisson pour évaluer la biotransformation de xénobiotiques, et les biomarqueurs couramment examinés. Source : Inspiré de (Franco and Lavado, 2019).

4.3.1 Les systèmes *in vitro* pour les études du métabolisme chez le poisson

↳ Microsomes et fractions S9

Les systèmes *in vitro*, tels que la fraction S9 ou les microsomes de foie, sont intéressants à plus d'un titre car ils peuvent être mis en œuvre rapidement et sont relativement peu coûteux. Ce sont donc des modèles de choix pour les études de screening à haut débit. La fraction surnageante S9 est obtenue à partir d'un homogénat d'organe (généralement le foie) centrifugé à 9000 g pendant 20 minutes dans un milieu approprié. Cette fraction contient le cytosol et les microsomes. Les microsomes, contenant les isoformes CYP450 et d'autres enzymes du réticulum endoplasmique, peuvent être isolés de la fraction S9 par une seconde centrifugation. Des fractions S9 de truite ont été utilisées afin d'estimer la clairance hépatique de produits pharmaceutiques, comme le diclofénac et le sulfaméthoxazole, par une approche de déplétion de substrat. Les résultats n'ont montré aucun métabolisme significatif mais plutôt une bioaccumulation (Connors et al., 2013). Zlabek et al ont utilisé les fractions microsomales dans

plusieurs études pour étudier le métabolisme de certains xénobiotiques et les CYP450 impliqués (Vestergren et al., 2012; Zlabek et al., 2016; Burkina et al., 2018a; Burkina et al., 2018b).

Pour des raisons économique et pratique, l'utilisation de fractions microsomales a été largement proposée pour des évaluations rapides du potentiel de bioaccumulation et de priorisation, un processus qui est devenu de plus en plus important depuis l'introduction de la réglementation européenne REACH en 2006. Le principe repose sur le fait qu'il existe une relation inverse entre le degré de métabolisme et le potentiel de bioaccumulation. Néanmoins ces systèmes *in vitro* ne reflètent qu'une partie de l'ensemble des processus métaboliques *in vivo* ou retrouvé dans des hépatocytes en culture primaire. Ces limitations, notamment l'absence de cofacteurs des enzymes de phase II, l'activité de courte durée dans les incubations et l'hypothèse inhérente d'absorption cellulaire de produits chimiques engendrent une prévision inexacte des taux métaboliques et des profils métaboliques (Uchea et al., 2013). Par conséquent, ces systèmes ne fournissent qu'une représentation partielle de la situation *in vivo* (**Tableau 12**).

↳ Hépatocytes primaires

Les hépatocytes sont responsables de la majorité des fonctions hépatiques comme notamment la biotransformation des xénobiotiques. Ils sont donc souvent employés afin de déterminer la pharmacocinétique et le potentiel toxique de xénobiotiques *in vitro*. Les hépatocytes en culture primaire représentent *a priori*, le modèle cellulaire hépatique le plus proche de la situation *in vivo* chez l'homme, décrit souvent comme le « Gold standard ». En revanche ils présentent beaucoup de variabilité intra et inter-espèces. Fraichement isolés, les hépatocytes ne conservent leurs caractéristiques et les fonctions spécifiques du foie que transitoirement, et des altérations fonctionnelles et phénotypiques sont rapidement observées. De plus, leur disponibilité et leur survie sont limitées (Guillouzo, 1998). Actuellement, la cryoconservation est la seule méthode disponible à long terme pour le stockage d'hépatocytes primaires. Les hépatocytes de poissons peuvent également être utilisés, en fonction de l'espèce ciblée afin d'obtenir des données de biotransformation pertinentes (Fay et al., 2017).

↳ Lignées cellulaires

Le premier intérêt pour les lignées cellulaires de poisson était principalement motivé par la pêche et leur intérêt économique pour l'étude des virus du poisson. Mais dans les années 80, ces lignées cellulaires ont également commencé à être utilisées lors d'études toxicologiques. Aujourd'hui, plus de 280 lignées cellulaires ont été établies, dont 43 sont commercialisées

(Lakra et al., 2011). Les lignées cellulaires de poissons sont considérées comme étant de meilleurs représentants que les lignées cellulaires de mammifères les plus couramment utilisées, car elles expriment des enzymes et des protéines spécifiques et peuvent être exposées à une plage de températures plus large pour l'incubation. Ils ne nécessitent pas d'incubateurs spécifiques complétés de dioxyde de carbone et peuvent être conservés pendant de longues périodes à 4°C, évitant les étapes de congélation et de décongélation inutiles. Elles sont donc plus faciles à entretenir et à manipuler et, contrairement aux cultures primaires, produisent des résultats hautement reproductibles (Wolf and Quimby, 1976). Elles ont été développées pour évaluer en particulier la toxicité des mélanges de produits chimiques tels que les HAPs, les produits pharmaceutiques ou encore les nanoparticules (Bermejo-Nogales et al., 2017).

D'autres tentatives pour rendre les systèmes *in vitro* plus réalistes, plus prédictifs et plus proche de l'*in vivo* ont reposé par exemple sur le développement de modèles tri-dimensionnels (3D) telles que les sphéroïdes d'hépatocytes pour prendre en compte les interactions cellulaires qui existent *in vivo*. Des sphéroïdes issues d'une lignée cellulaire hépatique de poisson de type RTL-W1 ont été produites et caractérisées fonctionnellement pour la première fois en 2019 (Lammel et al., 2019). Ces études suggèrent que les sphéroïdes des hépatocytes de truite arc-en-ciel conservent un statut biochimique, morphologique et fonctionnel élevé et qu'ils pourraient s'avérer être des modèles plus réalistes pour les tests de toxicité comparés aux monocouches 2D traditionnelles (Lammel et al., 2019). D'autres méthodes prometteuses dites méthodes de co-culture bénéficient des avantages apportés par les caractéristiques de plusieurs modèles cellulaires (Krøvel et al., 2011).

Tableau 12 : Principaux modèles issus de cellules hépatiques de poisson

<i>Modèle cellulaire</i>	Principales caractéristiques	Intérêt-Entretien	Référence
<i>microsomes</i>	Enzymes microsomales (CYPs), Systèmes non complets : pas d'organelles, pas d'enzymes et co- facteurs de conjugaison.	Economique. Conservation -80°C.	(Han et al., 2009)
<i>S9</i>	Cytosol (enzymes de conjugaison) et enzymes microsomales (CYPs), pas de cofacteurs de conjugaison.	Economique. Conservation -80°C.	(Uchea et al., 2013) (Connors et al., 2013) (OECD, 2018)
<i>Lignées cellulaires de foie (RTL-W1)</i>	Adhérentes, épithéliales. Faibles taux enzymatiques par rapport aux hépatocytes (CYPs et cofacteurs de conjugaison), Reproductibilité.	Maintenues dans le temps, résistantes aux $\Delta T^{\circ}C$. Plus simples que pour mammifères (faible taux métabolique).	(Lakra et al., 2011) (Thibaut et al., 2009)
<i>Hepatocytes primaires de poisson</i>	Membrane cellulaire intacte, caractéristiques préservées, variabilité (dépend de l'espèce) Nombreuses enzymes (CYPs et cofacteurs de conjugaison).	Stockage -135°C Maintenues peu de temps (pertes de capacité) mais facile d'utilisation (milieu, incubateur CO2 et T°C).	(Fay et al., 2017) (OECD, 2018)
<i>Sphéroïdes</i>	Cellules les plus représentatives du foie natif (forme, polarité). Expression des enzymes du métabolisme et des transporteurs membranaires.	Viables plus de 30 jours.	(Uchea et al., 2015) (Lammel et al., 2019)

4.3.2 Les enzymes CYP450 de biotransformation chez le poisson

Dans le milieu aquatique, l'exposition des organismes vivants aux xénobiotiques déclenche des interactions entre les systèmes chimiques et biochimiques, conduisant parfois à l'émergence chez l'animal de perturbations biochimiques et/ou à des réponse d'adaptation. Les biomarqueurs d'exposition sont des caractéristiques qui seront mesurées objectivement et évaluées comme indicateur d'un procédé biologique normal, d'un procédé pathologique, ou d'une réponse pharmacologique due à l'exposition de xénobiotiques (Van der Oost et al., 2003). Les voies générales généralement considérées sont le stress oxydant et le métabolisme. Une liste exhaustive de biomarqueurs de poisson a été examinée dans une revue portant sur l'estimation des risques environnementaux, comprenant: **les enzymes de biotransformation (phases I et II)**, les paramètres de stress oxydatif, **les produits de biotransformation (métabolites)**, les protéines de stress, d'autres protéines, et des paramètres divers (hématologiques, immunologiques, de reproduction, endocriniens, génotoxiques,

neuromusculaires, physiologiques, histologiques, morphologiques). Des voies plus spécifiques sont également analysées en fonction du type de produits chimiques pris en compte.

Lors de notre étude du métabolisme endogène, les activités enzymatiques CYP450 impliquées dans la biotransformation des xénobiotiques, ici les colorants, ont été examinées. Ces enzymes sont impliquées dans différentes phases du métabolisme comme explicité dans le paragraphe 1.3.3. Pour rappel, les enzymes de la superfamille CYP sont principalement responsables du métabolisme oxydatif de la phase I. Le CYP1A, essentiel et très instruit chez le poisson, est principalement responsable du métabolisme des HAP, des dioxines et des PCB et est induit par le récepteur nucléaire AhR. Son activité est un biomarqueur majeur en écotoxicologie. Le nombre d'isoformes du gène du CYP1 diffère entre les espèces de poisson. La truite arc-en-ciel détient au moins 6 isoformes (Jönsson et al., 2010). L'estimation de l'activité CYP1 se réalise facilement par la méthodologie de dosage de l'EROD (7-éthoxyresorufin O-deethylase). Le CYP3A est l'enzyme CYP la plus polyvalente. Elle est responsable du métabolisme de plusieurs types de produits chimiques, tels que les produits pharmaceutiques mais aussi les hormones stéroïdiennes. Chez le poisson, les CYP3 impliqués sont le CYP3A, dominant dans le foie, puis le CYP3B et le CYP3C. Le xénobiotique peut subir aussi une réaction de phase II consistant en la conjugaison des molécules hydrophiles avec le glutathion (GSH), l'acide sulfonique ou l'acide glucuronique avec pour objectif de faciliter leur excrétion. Les enzymes responsables sont les glutathion-S-transférases (GST), les sulfotransférases (SULT) et les UDP-glucuronosyltransférases (UGT). Enfin, en phase III, le composé métabolisé est excrété hors de la cellule. Le métabolisme se produit principalement dans le foie mais a également été observé dans d'autres organes tels que les branchies, l'intestin ou les reins (Van der Oost et al., 2003).

4.3.3 La truite arc-en-ciel comme modèle d'étude

↳ Une espèce très facile à élever

La truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) est l'espèce d'eau froide la plus étudiée, car les différents stades de maturité, de l'œuf à l'adulte, sont facilement disponibles pour des études (Wolf and Rumsey, 1985). L'habitat naturel de la plupart des truites arc-en-ciel est l'eau douce à une température d'environ 12 °C en été. L'espèce tolère des températures de 0 à 25 °C mais l'optimum pour une bonne santé se situe entre 10 et 12 °C tandis qu'une excellente croissance dans des conditions de bonne qualité de l'eau se produit entre 15 et 20 °C. Les poissons mâles arrivent à maturité entre 9 et 12 mois à l'écloserie, mais pour la plupart, les stocks ont tendance à mûrir jusqu'à l'âge de 2 ou 3 ans selon la température de l'eau et la disponibilité de la

nourriture (Gall and Crandell, 1992). Facilement élevée et maintenue dans des conditions de laboratoire, la truite arc-en-ciel est un modèle utile et une espèce standard pour les tests de toxicité notamment. Elle est considérée comme l'une des espèces les plus sensibles en matière de toxicité aiguë et donc recommandée pour ces tests par l'OCDE parmi les espèces d'eau douce. Un avantage majeur de la truite arc-en-ciel est la grande diversité de lignées cellulaires établies à partir de cet organisme, ce qui laisse l'opportunité de comparer des tests *in vitro* aux études *in vivo*.

↳ Les organes majeurs du métabolisme

Les branchies sont un organe d'une importance vitale pour les poissons. Responsable des échanges gazeux, de l'osmorégulation, de la diffusion ionique, de la régulation du pH, du bilan azoté, il est le principal site d'absorption des contaminants d'origine hydrique. Cet organe est également métaboliquement actif. En raison du rôle pivot des branchies, tout dommage peut avoir des conséquences graves sur l'état de santé de l'organisme et il présente donc un grand intérêt en écotoxicologie (Evans et al., 2005). Un deuxième organe d'importance majeure en écotoxicologie du poisson est le foie en raison de ses capacités métaboliques élevées et de son rôle crucial de détoxification. Il est également très important pour la vitellogenèse, c'est-à-dire la production des réserves alimentaires des alevins. Un large éventail de biomarqueurs liés à cet organe a été caractérisé.