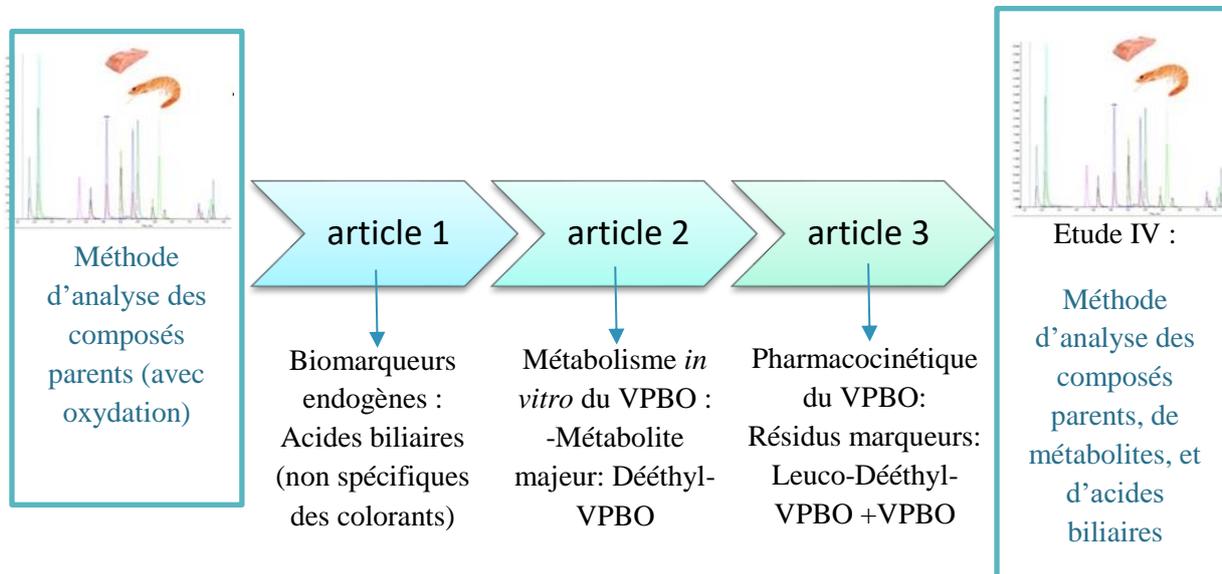

Développement analytique issu des travaux menés sur le métabolisme résultats préliminaires

1.1 Introduction

L'objectif de cette étude, qui a démarrée par un stage de Master 1 de 3 mois, était de tester l'intérêt et la faisabilité d'un développement de méthode incluant le ou les métabolites pertinents des études précédemment présentées. Le sujet portait donc sur un développement et une validation de méthode d'analyse multi-résidus de colorants dans les poissons d'aquaculture par LC-MS/MS, pouvant inclure les composés parents de colorants mais aussi des résidus marqueurs tels que leurs métabolites, ou des composés endogènes potentiellement marqueurs de traitement chez le poisson. Si l'on reprend le fil conducteur de cette thèse, l'amélioration de la surveillance des colorants dans les produits d'aquaculture pour faire face aux pratiques d'élevage interdites, ce développement rassemble les connaissances du travail accompli et offre de nouvelles perspectives de contrôle :



Le deuxième objectif de cette étude consistait à évaluer la sensibilité de la méthode pour détecter des composés interdits d'usage à des niveaux résiduels réglementairement acceptables. En effet, aujourd'hui en 2020, il est important de mettre au point une méthode d'analyse de ces colorants permettant de les détecter et de les identifier à une concentration atteignant 0.5 µg/kg, au moins pour les colorants principalement réglementés. Ce projet a permis de réaliser la mise au point des paramètres de spectrométrie de masse (réalisation d'infusions), l'optimisation de la séparation chromatographique (test de colonnes, de phases mobiles, de solvants de reprise...) puis l'optimisation de l'étape d'extraction dans la chair de poissons. Enfin, la méthode développée a été testée sur des échantillons de poissons d'aquaculture collectés dans le commerce local, ainsi que sur un échantillon officiel détecté positif en MG/LMG par un laboratoire de contrôle départemental. Le développement n'est pas encore finalisé à l'heure actuelle.

1.2 Matériel et Méthode

Colorants : Une liste de 14 colorants avec 4 leuco-bases a été établie pour cette étude ainsi que des standards internes deutérés du CV, MG, LCV et LMG. Les 4 leuco-bases incluses sont :

-LMG, leuco-base de MG

-LCV, leuco-base de CV

-LBG, leuco-base de BG, son standard analytique a été synthétisé par une société privée pour l'étude,

- et DLVPBO pour lequel seulement les transitions ioniques ont été incluses dans la méthode. En effet, la synthèse du standard n'étaient pas possible car l'identification structurale n'a pas été réalisée, car elle nécessiterait d'isoler suffisamment de DLVPBO de la matrice poisson pour effectuer des analyses structurales plus poussées (RMN, Infra-rouge),

Trois acides biliaires (l'acide taurodésoxycholique (TRDA), l'acide désoxycholique (DCA) et l'acide glycodésoxycholique (GCDA) ont également été insérés dans la méthode à titre expérimental dans un premier temps. En cas d'échantillons positifs en colorants, cela permettrait de corrélérer la présence du colorant à la concentration d'acides biliaires, mais Cela nécessite d'obtenir un grand nombre d'échantillons positifs.

Les solutions mères sont préparées à 100 mg/l dans les solvants de dilution appropriés (MeOH ou ACN).

Tableau 13 : Colorants et marqueurs de traitement inclus dans le développement

| <i>Famille</i> | Colorants | Résidu marqueur : Métabolite direct/métabolite endogène (de la truite) |
|--|------------------------------|---|
| <i>Triarylméthanes</i> | Vert de Malachite (MG) | Leuco Malachite Green (LMG) |
| | Vert Brillant (BG) | Leuco Vert Brillant (LBG) |
| | Cristal Violet (CV) | Leuco Cristal Violet (LCV) |
| | Ethyl Violet (EV) | |
| | Pararosaniline (PRRA) | |
| <i>Dérivés des Triarylméthanes</i> | Victoria Blue B (VBB) | |
| | Victoria Blue R (VBR) | |
| | Victoria Pure Blue BO (VPBO) | Leuco dééthyl VPBO (DLVPBO) |
| <i>Phénothiazines</i> | Methylene Blue (MB) | Azure B (AZB) |
| | New Methylene Blue (NMB) | |
| <i>Phenoxazines</i> | Nile Blue A (NBA) | |
| <i>Xanthènes</i> | Rhodamine 6G (RHG) | |
| | Rhodamine B (RHB) | |
| <i>Acides biliaires</i> | | TRDA |
| | | GCD A |
| | | DCA |

Matériel : solvants pour l'extraction et la LC-MS/MS de pureté appropriée, matériel d'extraction et de purification, évaporateur sous azote, centrifugation.

Tableau 14 : Colonnes chromatographiques testées

| <i>Fournisseur</i> | Colonne | Dimension | Taille de particule | Taux de carbone | End- Capping | Technologie |
|--------------------------|-----------------------|------------------|--------------------------------|----------------------------|-------------------------|----------------------------|
| <i>Waters</i> | Sunfire C18 | 150*2.1mm | 3.5 µm | 16 % | Oui | Spherical Particle |
| <i>Thermo Scientific</i> | Accucore Phenyl Hexyl | 100*2.1mm | 2.6 µm | 5 % | Oui | Spherical Solid Core |
| <i>Sigma-Aldrich</i> | Ascentis Express C18 | 100*2.1mm | 2.7µm | / | Oui | Fused-Core |
| <i>Phenomenex</i> | Kinetex Polar C18 | 150*2.1mm | 2.6µm | 12 % | Oui | Core Shell Silica |
| <i>Agilent</i> | Zorbax RX-C8 | 150*2.1mm | 5µm | 5.5 % | Non | Porous silica microspheres |

Appareil de LC-MS/MS : chaîne LC Surveyor couplée au TSQ Quantum Ultra (ThermoFisher)

1.3 Résultats de développement

Mise au point d'infusion

La réalisation d'infusion nous a permis de définir le « tube lens » et l'énergie de collision optimaux en identifiant pour chaque molécule 2 transitions majeures et une seule transition pour les acides biliaires, suffisante pour leur quantification. Cette première détection par spectrométrie de masse est réalisée par une infusion d'une solution des composés à 100 µg/L dans l'ACN acidifié. Une boucle d'optimisation est insérée sur le spectromètre afin de pouvoir infuser les solutions par l'intermédiaire d'une seringue.

Il faut noter ici que les ions formés dans la source sont des ions pseudo-moléculaire $[M+H]^+$ ou $[M]^+$ pour les colorants déjà chargés positivement, comme MG ou CV. Les ions sont donc détectés en mode électrospray ESI+. Cependant, pour les acides biliaires, il s'agit d'une détection des ions adduits $[M+NH_4]^+$ en raison de la formation d'un complexe avec l'acétate d'ammonium. Les acides biliaires sont par ailleurs couramment détectés en mode électrospray négatif ce que nous avons toutefois décidé de ne pas appliquer. Les transitions MRM des composés se trouvent en **annexe 1** et celles des standards internes en **annexe 2**.

Optimisation des paramètres de spectrométrie de masse en tandem

Cette opération d'optimisation des gaz est réalisée afin de trouver le bon compromis pour nébuliser et désolvater la solution contenant les ions à analyser. Ici, l'optimisation est réalisée par un système de T, en introduisant dans la seringue une solution de colorant à 100 µg/L en même temps que la phase mobile au débit qui sera utilisé.

Tableau 15 : Paramètres de gaz optimisés

| | |
|-------------------------------|-----------------------|
| <i>Spray Voltage</i> | 3500 |
| <i>Sheath Gas Pressure</i> | 30 (unité arbitraire) |
| <i>Ion Sweep Gas Pressure</i> | 5 (unité arbitraire) |
| <i>Aux Gas Pressure</i> | 10 (unité arbitraire) |
| <i>Capillary Temperature</i> | 350 °C |

Optimisation de la chromatographie liquide

Les tests de gradient ont été réalisés sur toutes les molécules. Cependant, en raison du grand nombre de données, les résultats seront présentés pour le colorant AZB avec la colonne Ascentis

Express C18 (Sigma) (**Figure 30**). La phase aqueuse utilisée est « Eau + 10 mM acétate d'ammonium + 0.1 % d'acide formique » et la phase organique est « ACN ». Les premiers tests n'ont pas été très concluant. En effet, sur le premier chromatogramme (A), le temps de rétention de AZB se trouve dans le temps mort de la colonne (1.63 min). En ajustant le gradient et le temps de passage en phase organique, les temps de rétentions ont été décalés à 2.33 min (B,C) cependant, les pics étaient assez larges et mal résolus. Pour pallier à ce problème, une autre colonne a été mise en place : il s'agit de la colonne Sunfire (Waters) (**Figure 31**).

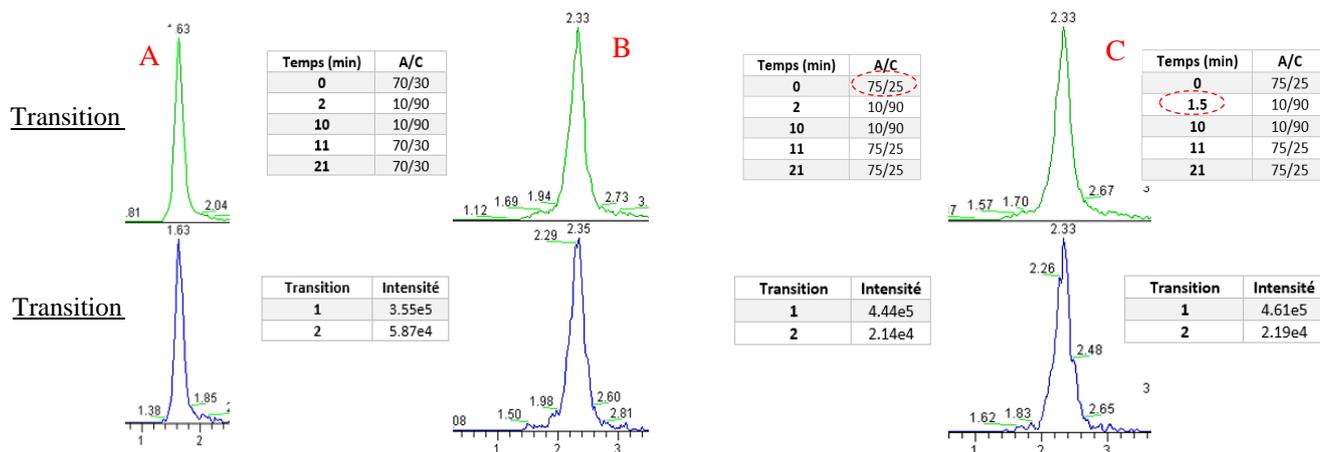


Figure 30 : Chromatogrammes obtenus pour AZB avec la colonne Ascentis Express C18 (Sigma)

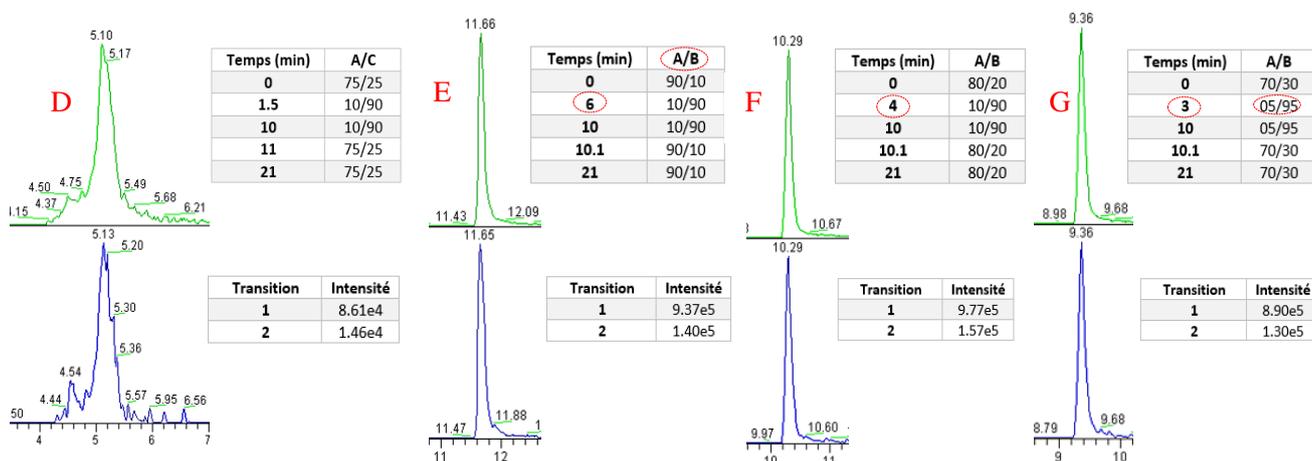


Figure 31 : Chromatogrammes obtenus pour AZB avec la colonne Sunfire "Waters"

En raison de pics mal résolus et de temps de rétention trop court (A, B, C), la colonne Sunfire de chez Waters a été testée car elle a été choisie lors d'une ancienne étude sur BG. Sur les chromatogrammes (D, E, F, G), un changement de phase mobile a été réalisé mais aussi la vitesse de passage en phase organique (gradient d'élution). Nous avons observé qu'il est

optimal d'utiliser le MeOH comme phase organique avec un temps de passage en phase organique de 3 minutes pour avoir des pics bien résolus et des temps de rétentions satisfaisants. Pour pousser les recherches, une autre colonne avec une nouvelle technologie a été testée afin de comparer les résultats obtenus avec la colonne Sunfire de chez Waters : il s'agit de la colonne Accucore Phenyl Hexyl de chez Thermofisher (**Figure 32**).

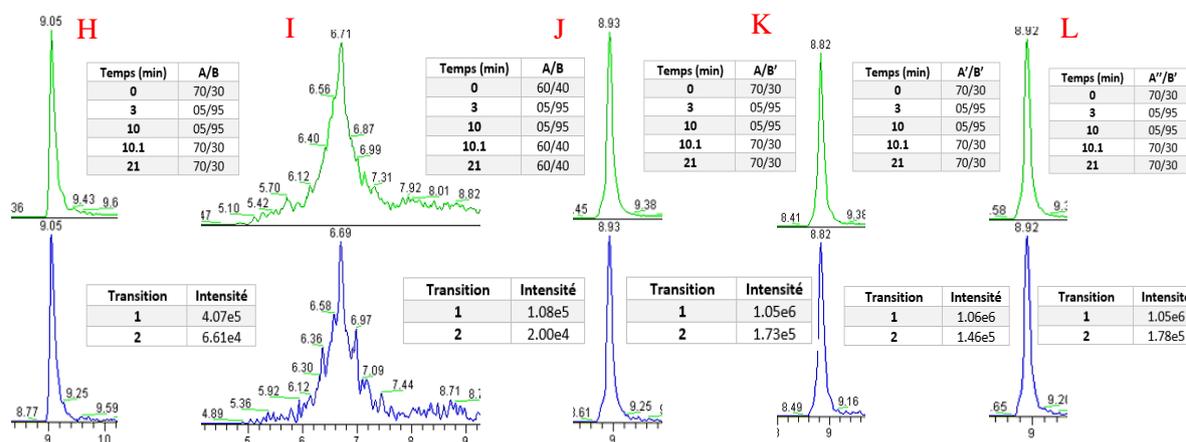


Figure 32 : Chromatogrammes obtenus pour AZB avec la colonne Accucore Phenyl Hexyl (Thermo)

D'autres tests de gradients ont été réalisés avec la colonne Accucore Phenyl Hexyl. D'après les chromatogrammes (H, I, J), le meilleur gradient optimal que nous avons sélectionné est le (J). Cette colonne a donc été choisie pour le début de notre phase de développement du protocole d'extraction. Cependant, au cours de notre développement de méthode, un problème chromatographique a été constaté durant les tests de gammes. Trois molécules (MB, NBA et NMB) interféraient avec la colonne Accucore Phenyl Hexyl en laissant paraître sur les chromatogrammes des trainées de pics (**Figure 33**). Ceci est dû à une interaction liée avec les molécules et la silice résiduelle (non greffée) de la colonne. Pour résoudre ce problème rencontré, un changement de colonne a été réalisé en adoptant la **colonne Sunfire** (Waters). Cette nouvelle colonne a été choisie en raison de ses chromatogrammes satisfaisants obtenus lors de l'optimisation de la colonne. Un nouveau gradient (**Tableau 16**) a été défini pour avoir des pics bien résolus dans un intervalle de temps de 7 à 13 min.

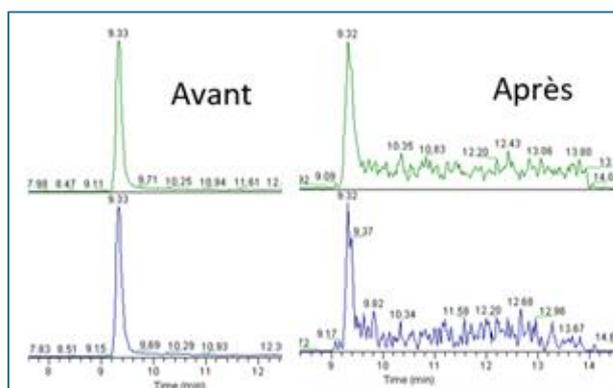


Figure 33 : Dégradation de la colonne Accucore Phenyl Hexyl pour le colorant MB

Le nouveau gradient défini est le suivant :

Tableau 16 : Gradient pour les conditions finales avec la colonne Sunfire (Waters)

| <i>Temps en minutes</i> | <i>A''/B'</i> |
|-------------------------|---------------|
| 0 | 70/30 |
| 2 | 5/95 |
| 10.1 | 5/95 |
| 11 | 70/30 |
| 21 | 70/30 |

De plus, une étude de comparaison sur la proportion d'acétate d'ammonium contenue dans la phase aqueuse a été réalisée (chromatogramme J, K, L). Les concentrations testées sont 5 mM, 10 mM et 20 mM en présence de phase organique « MeOH+ 0.1 % acide formique ». La proportion d'acétate d'ammonium n'a pas de réelle différence sur les pics des colorants analysés à l'exception des acides biliaires. Pour la suite de ce développement, la proportion choisie est 20 mM afin de faciliter les adduits ammonium. Un chromatogramme final est présenté en **annexe 3**.

Optimisation du solvant d'extraction

Le premier élément optimisé dans le protocole d'extraction est le solvant d'extraction afin d'évaluer sa capacité à extraire les molécules de la matrice (chair+ peau de poisson), notamment en faisant précipiter les protéines. Plusieurs conditions d'extractions ont été testées : solvants seuls (MeOH, ACN), mélanges de solvants pour faire varier la polarité (MeOH/hexane) ou l'acidité (solvant + acide ou tampon), et essai d'ajout d'hydroxylamine avant l'extraction pour faciliter l'extraction (**Figure 34**). Chaque essai a été comparé avec un blanc afin de pouvoir calculer le rendement total de chaque colorant extrait de la matrice après l'ajout de la solution

de supplémentation en colorant et la solution de standard interne. Les résultats pour cette étape d'extraction se porteront ci-après sur l'AZB.

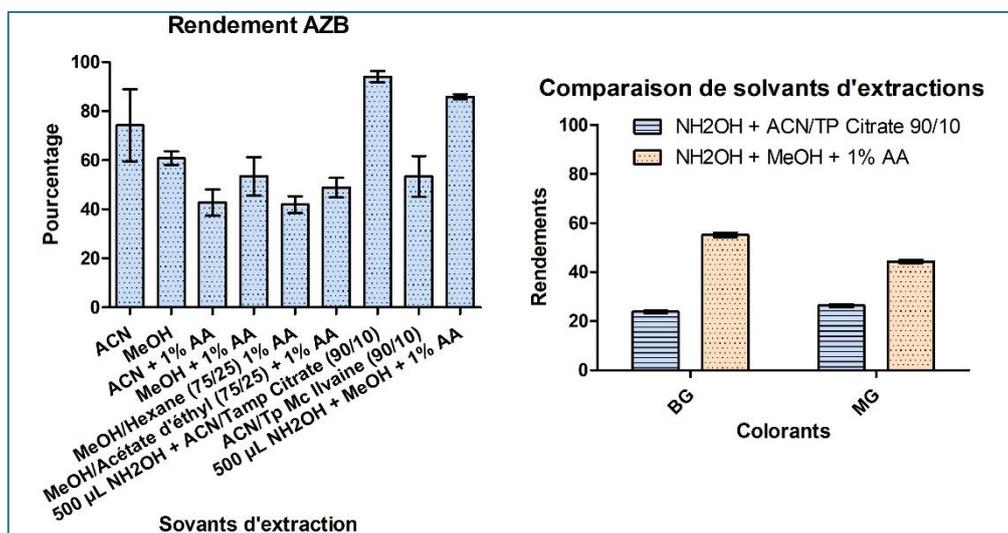


Figure 34 : Comparaison de solvants d'extractions

D'après la **Figure 34**, le rendement d'extraction varie suivant le type de solvants. En effet, l'ajout d'hydroxylamine suivit par l'extraction par un mélange de solvant de « ACN/Tampon Citrate 90:10 » paraissent des conditions favorables pour une extraction optimale de AZB. Cependant, au vu de tous nos colorant analysés, ce solvant n'a pas été retenu en raison de faible rendement pour BG et MG. Le solvant choisi pour la suite des manipulations est donc le « MeOH + 1 % en acide acétique » avec un ajout de 500 µL d'hydroxylamine au préalable.

Optimisation du solvant de reprise

Le solvant de reprise est un mélange de solvant utilisé afin de dissoudre le résidu à sec obtenu après évaporation à 50°C. Il sera ensuite filtré dans un filtre à 0.45µm et injecté dans la LC-MS/MS. Il doit donc être compatible avec la phase mobile et la solubilité des molécules. Pour cela, 4 solvants de reprise ont été testés afin de comparer les intensités des pics et leur forme. D'après le **Tableau 17**, le solvant de reprise choisi est donc « ACN/EAU 80:20 » en raison des intensités de pics supérieures aux autres mais aussi pour une meilleure stabilité des molécules. Le tableau récapitulatif des intensités de pics est représenté en **annexe 4**.

Tableau 17 : Comparaison d'intensité de pics suivant le solvant de reprise

| Solvants de reprise testés | ACN/EAU 80:20 | ACN/Acide Ascorbique (100:1) | ACN/Phase A/Acide Ascorbique (70:25:5) | MeOH/Phase A/ Acide Ascorbique (70:25:5) |
|----------------------------|------------------|------------------------------------|---|---|
| Intensité des pics | 1,16E+06 | 2,50E+05 | 7,92E+05 | 7,04E+05 |

Mise en place d'une étape de purification

Lors du premier essai, un kit QuEchERS « MgSO₄ 4g /NaCl 1g » (référence : agilent technologies, Bond Elut - Original QuEchERS extract pouches) a été testé avec comme solvant d'extraction le « MeOH+1 % Acide Acétique ». Puis l'extractions avec le premier kit a été testé avec une purification complémentaire comprenant « MgSO₄ 1.5 g /C18 0.5 g » (référence : Interchim – Clean up Kit) mais en faisant varier le solvant d'extraction.

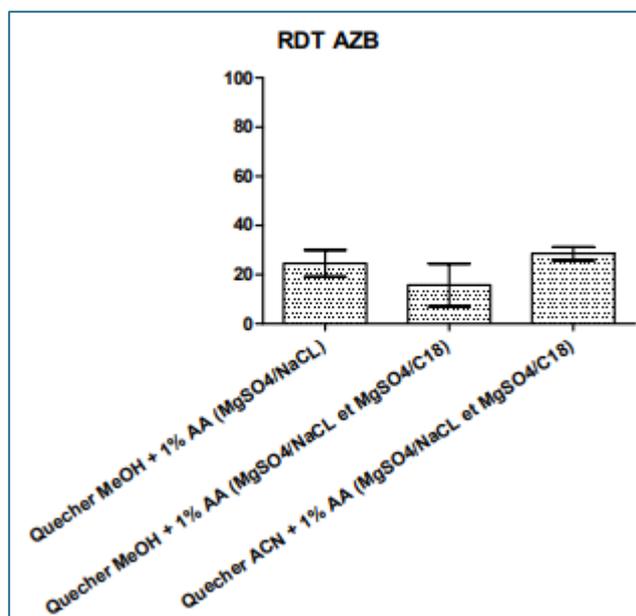
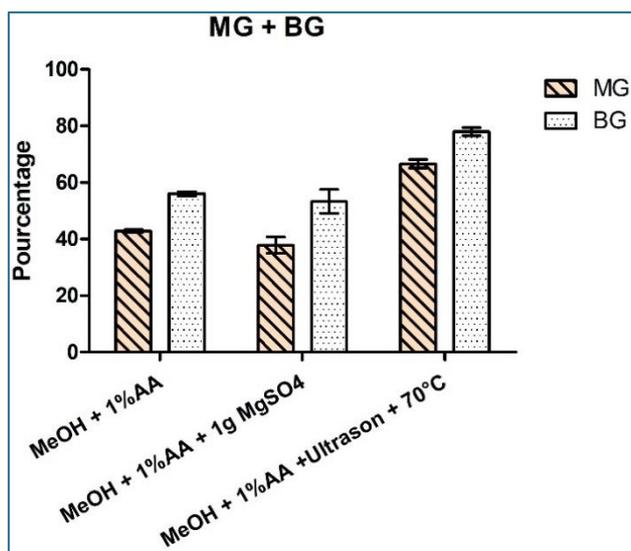


Figure 35 : Rendements d'extraction QuEchERS

Les résultats donnés en **Figure 35** montrent que l'utilisation de QuEchERS n'est pas très efficace concernant l'extraction des colorants (ici AZB) dans la chair de poisson. Les molécules restent probablement absorbées par les sels. L'étape de purification QuEchERS n'a donc pas donné suite pour l'optimisation de notre protocole d'extraction.

Amélioration de l'étape d'extraction

Après avoir déterminé les conditions d'extraction les plus appropriées, par « 500 μ L d'hydroxylamine / MeOH + 1 % Acide Acétique », ainsi que le solvant de reprise par « ACN/EAU 80 :20 », des améliorations ont été mises en place afin d'obtenir de meilleurs rendements en particulier pour BG, LBG, MG, LMG, CV et LCV ainsi que pour les standards deutérés LMG-D₅ et MGD₅.



Après avoir réalisé des recherches bibliographiques, il est possible d'insérer une étape d'ultrason avec un chauffage à 70 °C. Les résultats ont montré qu'il est nécessaire d'avoir une étape de chauffage avec ultrason afin d'avoir de meilleurs rendements pour le vert de malachite (MG) et le vert brillant (BG) comme présenté en **Figure 36** mais aussi pour tous les autres colorants (Cf : **Annexe 6**). Le rendement moyen pour tous les colorants avec cette étape avoisine les 82 %.

Figure 36 : Amélioration du protocole d'extraction (exemple pour MG + BG)

Mise en place de la gamme d'étalonnage

Concernant la gamme d'étalonnage mise en place dans la matrice, certains niveaux de concentration ont dû être réévalués à la hausse (NBA- NMB – PRRA – AZB + 3 acides biliaires) en raison d'un manque de sensibilité du TSQ Quantum et d'une moins bonne sensibilité de ces molécules. Les niveaux de concentration adaptés pour l'analyse de colorants dans les poissons sont donnés en **annexe 5**.

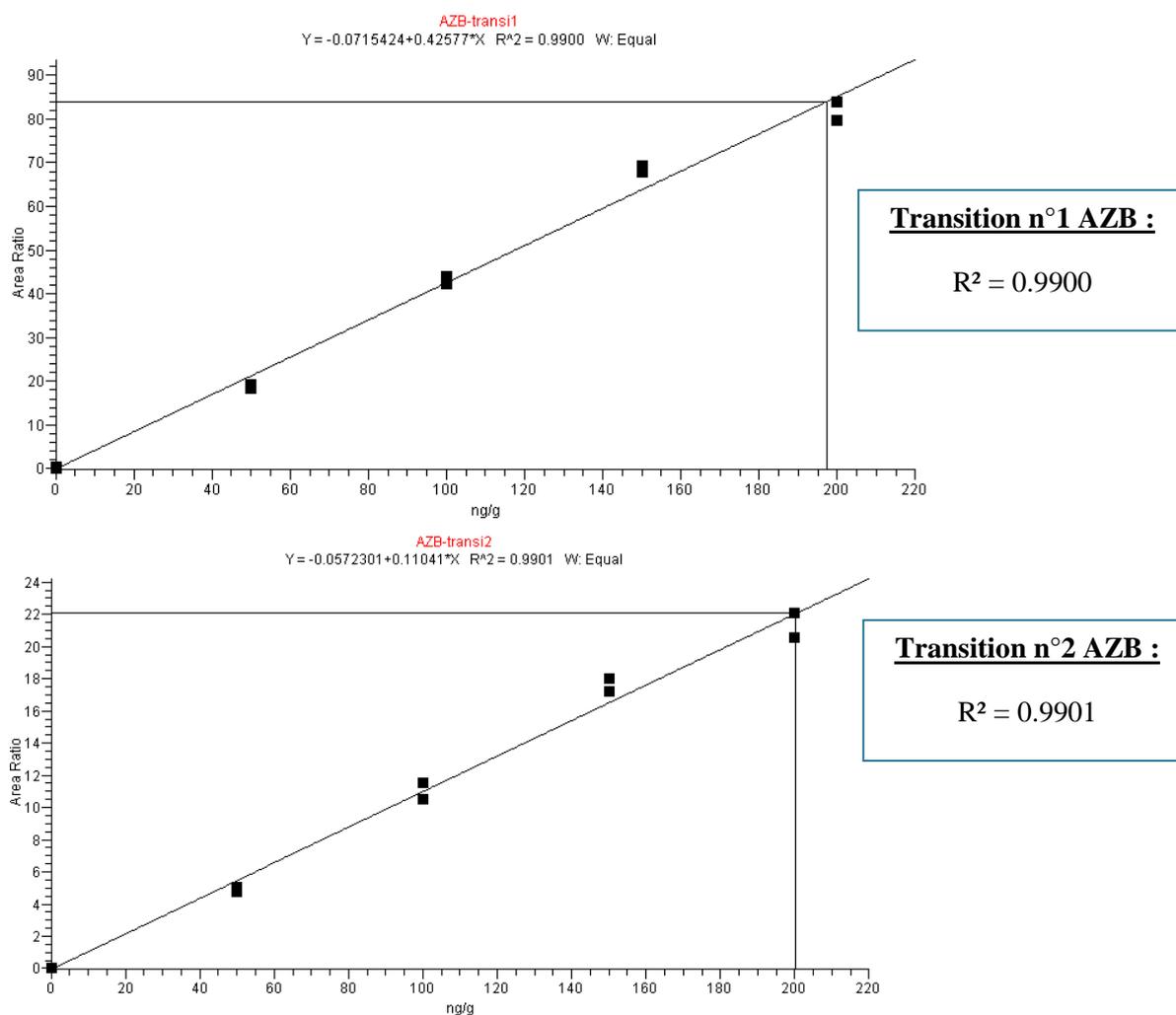


Figure 37 : Représentation des gammes d'étalonnage pour AZB

D'après ce que l'on peut constater, les essais de gammes pour la transition 1 et 2 du colorant AZB conduisent à des coefficients de détermination satisfaisants (**Figure 37**).

En réalisant les essais de gamme, nous nous sommes rendus compte que les leuco-bases n'étaient pas très stables d'une injection à une autres. Il y a eu une modification du solvant de reprise en remplaçant « ACN/EAU 80:20 » par « ACN/EAU/Acide Ascorbique 1g/L 80:15:05 » afin d'améliorer la stabilité de ces dernières. En effet, l'acide ascorbique est un anti-oxydant, et ralentit l'oxydation spontanée de la forme réduite leuco en forme parent oxydée.

Le protocole final choisi pour ce développement de méthode (**Figure 38**) a permis d'obtenir des rendements d'extraction supérieurs à 70 % pour les colorants et supérieurs à 50 % pour les acides biliaries (Cf. **annexe 6**).

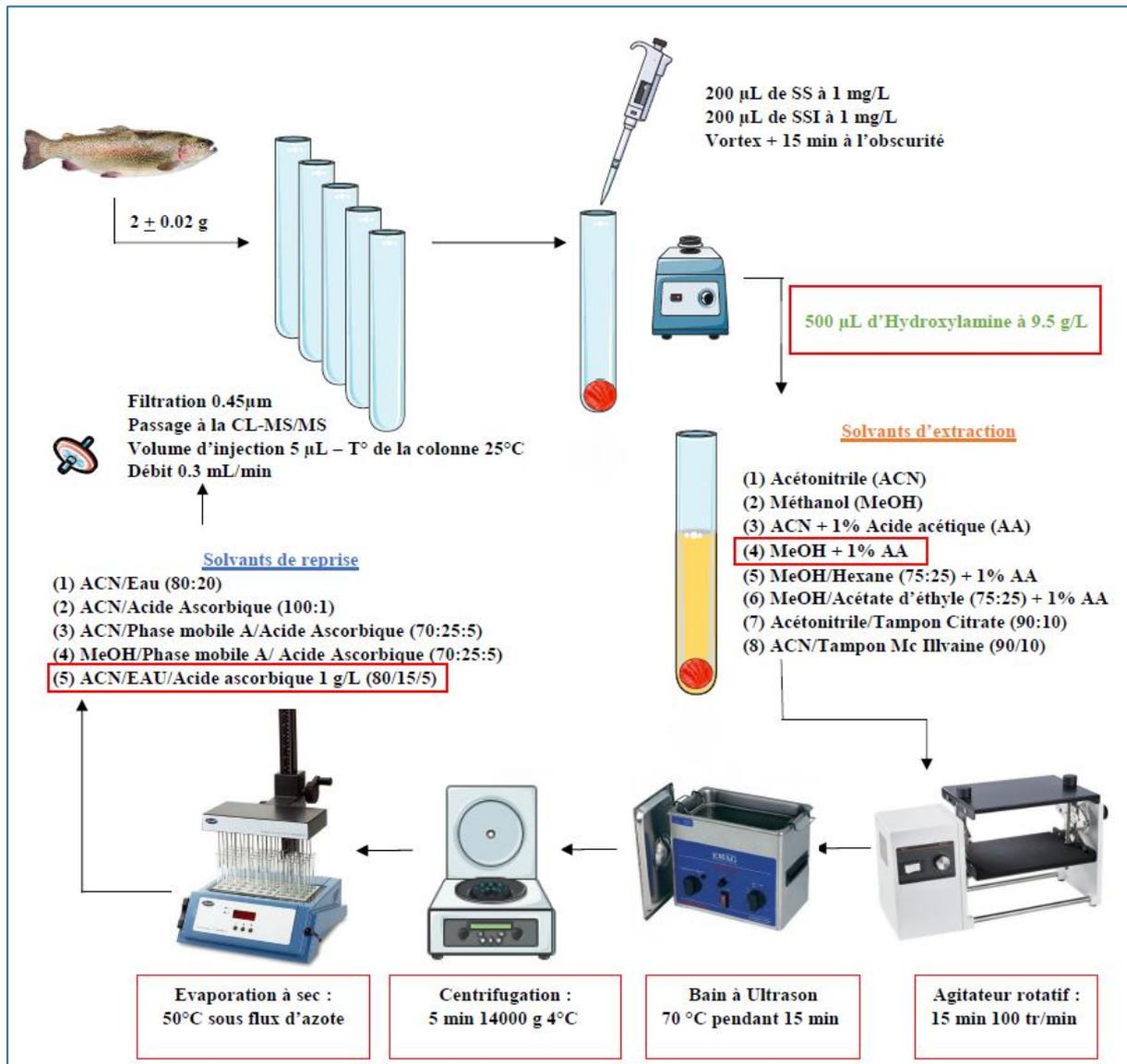


Figure 38 : Protocole d'extraction optimal des colorants et résidus marqueurs

Application de la méthode sur des échantillons terrain

L'objectif du stage était aussi de tester la méthode sur des échantillons terrain. Une étude d'occurrence restreinte a d'abord été réalisée, sur 18 poissons d'origines et d'espèces différentes (**Figure 39**). Les résultats du dépistage se sont avérés négatifs.



Figure 39 : Etude d'occurrence restreinte pour applicabilité de la méthode développée

Ainsi, nous avons cherché à obtenir des échantillons positifs en contactant les laboratoires agréés pour les analyses de colorants. Un échantillon de poissons chat a été confirmé en MG/LMG (Figure 40). Les résultats ont été en accord avec ceux annoncés par le laboratoire de Vendée. De plus, nous avons pu constater une présence détectable de DCA et TRDA alors que ces acides biliaires n'étaient pas détectés dans le poisson chat témoin.

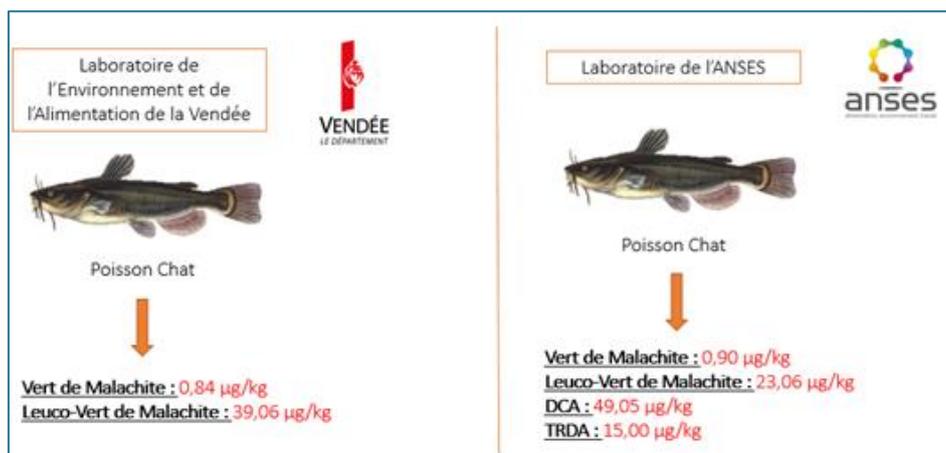


Figure 40 : Applicabilité de la méthode sur un échantillon positif en MG

1.4 Conclusion et perspective analytique

Si une méthode de confirmation des résidus de colorants par LC-MS/MS avec étape d'oxydation avait été développée et validée au début de notre projet, celle-ci avait néanmoins trouvé ses limites. En effet, l'oxydation peut s'avérer intéressante pour un nombre très restreint de composés, subissant la même réduction métabolique, comme MG et CV biotransformés en LMG et LCV. Mais un des problèmes avec les colorants réside en leur caractère électrostatique. Ils peuvent facilement contaminer des échantillons pendant les manipulations de préparation de

standards et d'échantillons et lors de l'analyse par LC-MSMS elle-même. La présence de métabolites et autres biomarqueurs extraits de l'échantillon apporte alors une information précieuse et une preuve formelle d'un traitement suspicieux.

C'est pourquoi le développement de cette nouvelle méthode apporte des perspectives intéressantes. Ce projet développé durant 3 mois a permis de mettre en place une méthode d'identification et de quantification de colorants susceptible d'être utilisés dans les bassins d'aquaculture. Il s'agit d'une méthode sensible pouvant atteindre des concentrations limites de 0.5 ppb pour certains colorants. Elle inclut les principaux colorants préoccupants (évalués par l'EFSA), mais aussi de nouveaux métabolites, le LBG (métabolite du BG) pouvant être quantifié grâce à la synthèse récente d'un standard analytique, et le DLVPBO suivi par ses transitions en dépistage (métabolite du VPBO). Les différents paramètres d'extractions ont été développés pour extraire au mieux les colorants présents dans le muscle de poissons.

Par la suite, cette méthode pourrait être validée sur un appareil de LC-MS/MS plus récent de type API 5500 afin de descendre encore en limites analytiques, si l'Union Européenne décide la mise en place de cette méthode en raison d'un risque sanitaire. Cet appareil permettrait de descendre plus bas en concentration pour AZB, PRRA, NBA et NMB. La méthode pourrait alors être validée sur trois jours dans plusieurs espèces de poissons et de crustacés. Il serait également intéressant de conserver les acides biliaires dans la méthode afin d'acquérir des données sur leurs perturbations lorsqu'un échantillon est positif en colorants, non seulement pour la truite, mais aussi pour d'autres espèces.

Pour avancer sur ce projet, il serait intéressant d'introduire des métabolites, s'avérant être des résidus marqueurs des autres colorants qui viendraient confirmer une métabolisation de colorants dans le foie, et donc qui prouveraient une présence de colorants en tant que traitement vétérinaire, ou aussi d'occurrence environnementale.

Partie IV : Discussion générale et perspectives

Les molécules interdites en élevage font l'objet d'une surveillance accrue, par des plans de contrôle de leurs résidus chimiques dans les denrées alimentaires et par des inspections des importations aux postes frontaliers. Les méthodes analytiques pour détecter et confirmer ces résidus doivent être adaptées aux échantillons prélevés et aux contaminants présents (médicaments, contaminants de l'environnement). Les résidus de colorants à usage thérapeutique aujourd'hui interdits en Union Européenne font ainsi l'objet d'un contrôle dans les denrées d'origine animale, principalement les produits d'aquaculture. L'objectif de cette thèse était d'explorer différentes approches analytiques permettant de proposer une évolution de la surveillance des mésusages de colorants en tant que molécules à activité pharmacologique.

En effet, les contrôles officiels ciblent à l'heure actuelle 3 colorants principaux (MG, CV, BG) et leurs métabolites (LMG, LCV, LBG). Malgré leur interdiction en élevage, ces colorants sont toujours utilisés comme l'indique ces 15 dernières années le système d'alerte européen (RASFF). D'autres molécules dérivées, comme le VPBO, sont probablement aussi testées de par le monde et présentes sur le terrain, pouvant engendrer également des problèmes de santé publique. De plus, l'évaluation des risques incite à regarder non seulement les dangers connus (on ne trouve que ce que l'on cherche), mais également rétrospectivement des dangers inconnus jusque-là, comme des métabolites plus toxiques, des adduits, des produits de dégradation...

Ainsi, le fil conducteur de cette thèse peut se résumer par la question clé suivante: **Quelle stratégie analytique adopter pour une surveillance sans faille dans le futur cadre réglementaire pour le cas des colorants interdits en traitement aquacole?** Autrement dit comment disposer d'une méthode évolutive et exhaustive, adaptée au réseau de contrôle national et européen. Le travail qui a été envisagé pour y répondre, et les résultats associés (**Tableau 18**), s'est déroulé en plusieurs étapes successives ou simultanées.

Tableau 18 : Principaux résultats des études réalisées, avantages et inconvénients associés

| Approches | Résultats | Apports | Limites |
|---|--|--|--|
| Métabolomique non ciblée (phase animale-truite: 8 jours) | -Pas de marqueurs communs (VPBO≠MG) -2 métabolites endogènes identifiés (acides biliaires) -quelques métabolites exogènes déterminés | -Très peu de tri des signaux: « Full scan » -Marqueurs d'effets ⇒ Mise en évidence de nouveaux traitements | -Dépend des conditions d'extraction -Traitement des données -Annotation -Spécificité |
| Métabolisme <i>in vitro</i> | -16 métabolites de phase I, aucun de phase II -Principal métabolite identifié (dééthyl-VPBO) | -Etude rapide, peu coûteuse -Identification des principales réactions métaboliques | -Molécules parents spécifiques -Vérifier adéquation des résultats <i>in vitro</i> avec une étude animale restreinte |
| Métabolisme <i>in vivo</i>, pharmacocinétique (phase animale-truite :65 jours) | -14 métabolites de phase I et un de phase II. -principal métabolite identifié (leuco-dééthyl-VPBO) -demi-vies comparées | -Détermination fiable des résidus marqueurs sur une période de déplétion choisie en fonction du terrain | -Phase animale (utilisation d'animaux) -Etude plus longue/couteuse |

⇒ Choix des molécules : les triarylméthanes (MG) et leurs dérivés (VPBO)

Le choix de ces familles pour réaliser la première étude de métabolomique nous est apparu assez logique. Nous souhaitons développer nos compétences dans ce domaine en les appliquant aux molécules dont nous sommes responsables en tant que laboratoire de référence. Les substances vétérinaires non autorisées que sont les colorants sont intéressantes pour cela. L'approche métabolomique non ciblée pour la découverte de résidus marqueurs identifiés par un effet biologique, avait déjà fait ses preuves avec par exemple la démonstration apportée sur traitement illicite de bovins par des promoteurs de croissance (Dervilly-Pinel et al., 2012). Pour notre étude, MG et VPBO étaient des modèles de molécules intéressantes pour les raisons évoquées dans ce manuscrit, l'une étant très connue en traitement aquacole et l'autre absolument pas. Ces deux molécules, représentatives de deux familles structurellement proches, présentent non seulement un intérêt de par leurs propriétés pharmacologiques, mais aussi du fait de leur occurrence dans l'environnement de par leur utilisation dans l'industrie notamment du textile. L'idée que tout est lié en matière de santé (le « One Health » concept) renforce l'idée de définir des résidus marqueurs pertinents, pour le contrôle alimentaire, et pour la contamination de l'environnement, même si ce n'est pas toujours aisément réalisable.

Ce choix s'est confirmé par une récente étude dans le cadre du programme « Tox21 » aux Etats-Unis. La toxicité de 10 000 substances chimiques a été étudiée au moyen de 70 tests cellulaires

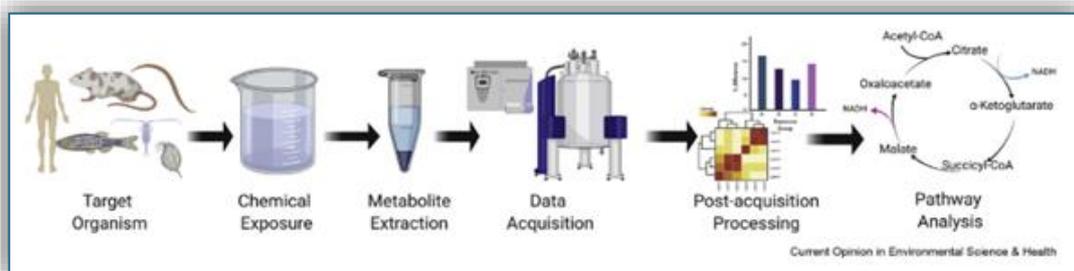
différents couvrant plus de 200 voies de signalisation cellulaire, MG a été classé parmi les 30 médicaments les plus actifs. Le VPBO (basic blue 7) a été quant à lui déclaré l'un des composés les plus actifs parmi les contaminants de l'environnement (Ngan et al., 2019).

Perspective 1

Une des perspectives pour donner suite à cette étude serait de poursuivre la recherche de résidus marqueurs pour d'autres colorants, comme les autres Victoria blue (victoria blue B, victoria blue R), pour lesquels il n'y a actuellement pas de données directes disponibles pour engager une évaluation de risques.

⇒ **Apport et limites de la métabolomique non ciblée en sécurité chimique des aliments**

L'étude de métabolomique non ciblée réalisée au moyen de la LC-HRMS visait à rechercher chez le poisson des résidus marqueurs pouvant être corrélés à un traitement en aquaculture par un ensemble de colorants proches thérapeutiquement et structurellement. Des traitements illicites pourraient alors être facilement tracés et contrôlés grâce à l'effet biologique induit sur le métabolome des poissons si cet effet s'avérait être suffisamment spécifique. Nos résultats n'ont malheureusement pas mis en évidence une substance endogène commune aux deux traitements. Néanmoins, nous avons pu dégager un effet du MG ou du VPBO sur le métabolisme des acides biliaries. Le MG semble induire une sous-expression de l'acide tauroursodésoxycholique tandis que VPBO induirait une sur-expression d'acide glycodéoxycolique. Ces modifications du métabolisme cellulaire provoquées par ces 2 molécules n'ont pas pu donner lieu jusqu'à présent à une interprétation biologique de leur action. L'ultime but de ce genre d'étude serait de proposer un chemin métabolique complet et fiable dû au mode d'action des colorants (Labine and Simpson, 2020).



**Figure 41 : Workflow conventionnel utilisé lors des expérimentations de métabolomique environnementale.
Source : (Labine and Simpson, 2020)**

Le métabolisme des acides biliaires semble bien être impacté, comme probablement celui d'autres substances endogènes, par des facteurs chimiques de contamination environnementale, comme l'a démontré une étude sur les modifications de métabolome des poissons (*Rutilus rutilus*) exposés à des effluents de traitements d'eaux usées (David et al., 2017).

Outre la génération de premières données de métabolisme chez la truite, l'approche de métabolomique non ciblée nous a permis de détecter et de confirmer la présence des métabolites directs de MG et de VPBO. L'intérêt d'une telle approche, vise aussi à maximiser la couverture des métabolites issus d'ensembles d'échantillons biologiques. Elle s'effectue sans à priori sur les types de signaux détectés donc elle offre la possibilité de capter aussi des signaux non suspectés, même si la grande majorité des caractéristiques métaboliques mesurées restent non identifiées (López-Ruiz et al., 2019). Cependant ce type d'approche dépend énormément des conditions expérimentales : animaux sélectionnés, organisation des prélèvements, conservation des échantillons, choix de l'extraction des molécules, de l'acquisition et du traitement du signal... Par exemple, nos chromatogrammes comportaient un bruit de fond important et la filtration des signaux pour des masses supérieures à 750 Da a été nécessaire. L'obtention de données biologiquement exploitables à partir des profils métaboliques issus d'analyses LC-HRMS en full scan reste donc limitée sur une gamme de masses moléculaires. De plus, l'analyse et la manipulation de ces données est très coûteuse en temps et reste encore trop souvent éloignée d'une interprétation biologique formelle. Enfin, de faibles signaux peuvent être écartés alors que pris dans un ensemble concomitant de faibles effets, ils pourraient être pertinents et révélateurs d'effets.

Perspective 2

Si une nouvelle étude de métabolomique était envisagée, il serait appréciable de compléter nos données par une approche de profilage, en ciblant cette fois-ci certaines voies métaboliques d'intérêt chez le poisson, donc avec à priori en adaptant la méthodologie appliquée. Il pourrait également s'avérer intéressant de mettre en œuvre des outils non létaux lors de l'expérimentation animale. Ces outils sont souvent utilisés pour la surveillance en temps réel des modifications métaboliques d'un organisme face à son environnement (Roszkowska et al., 2019).