
Les résidus de colorants dans les produits d'aquaculture

Ce chapitre présente la problématique d'un développement durable de l'aquaculture afin de répondre à la demande mondiale de consommation de poissons, en particulier ceux issus de l'aquaculture. Certaines maladies touchant cette filière en forte expansion, et les traitements médicamenteux sont parfois employés pour combattre celles-ci mais au détriment de la santé des consommateurs eux-mêmes. Par exemple, les résidus de substances interdites comme les colorants pouvant représenter un risque pour la santé humaine.

1.1 L'aquaculture en constante progression

1.1.1 Le poisson, une source essentielle de nourriture pour l'Homme



Les produits de la mer font partie du régime alimentaire des hommes dans leur Histoire. On retrouve des traces de consommation de poissons et coquillages depuis bien avant l'antiquité (Barrett, 2019). L'attrait et la consommation de poissons sont d'ailleurs intégrés jusqu'à aujourd'hui aux traditions culturelles de nombreux peuples. Dans certaines populations, le poisson est la principale source de nourriture et de nutriments essentiels. Il leur fournit de l'énergie, des protéines et toute une gamme d'autres éléments nutritifs importants, notamment les acides gras polyinsaturés à longue chaîne. Parmi la population adulte en général, la consommation de poisson, en particulier de poisson gras, réduit le risque de mortalité par maladie coronarienne. Aujourd'hui, la croissance démographique mondiale représente un enjeu majeur pour répondre à la demande nutritive de la planète. Aussi, les produits d'aquaculture, ainsi que les micro-algues, les insectes, les protéines monocellulaires et les co-produits, représentent un potentiel énorme d'apport nutritif dans l'exploration des protéines alternatives (Kim et al., 2019).

L'utilisation la plus courante des ressources halieutiques, c'est-à-dire les ressources vivantes aquatiques, est sous forme alimentaire. Plus de 75 % de la production mondiale de poisson est destinée à la consommation humaine directe, et la consommation de poisson frais croît aux dépens d'autres formes de produits à base de poisson (poisson en conserve, par exemple). Le

poisson débarqué non destiné à la consommation humaine directe est réduit en farine de poisson et en huile, principalement pour les porcs et les poulets et, plus récemment, pour l'élevage d'espèces aquatiques carnivores (telles que le saumon, la crevette, le bar, la dorade, etc.).

1.1.2 L'Asie, principal producteur de produits d'aquaculture

Nous comprenons donc pourquoi, dans ce contexte de besoin de ces ressources, l'aquaculture a un rôle majeur à jouer pour l'avenir. Mais tout d'abord redéfinissons le terme « aquaculture », afin de mieux appréhender ce challenge. L'aquaculture consiste dans la culture d'organismes aquatiques, y compris poissons, mollusques, crustacés et plantes aquatiques. Le terme « culture » implique une quelconque forme d'intervention dans le processus d'élevage en vue d'améliorer la production, telle que l'empeisonnement à intervalle régulier, l'alimentation, la protection contre les prédateurs, etc. Plus précisément, cet élevage d'organismes aquatiques se situe dans les zones côtières et intérieures appelant une intervention dans le processus d'élevage en vue d'en améliorer la production. Selon la FAO, c'est probablement la filière de production alimentaire qui connaît la croissance la plus rapide, et elle produit actuellement 50 % des poissons destinés à la consommation humaine dans le monde (**Figure 1**).

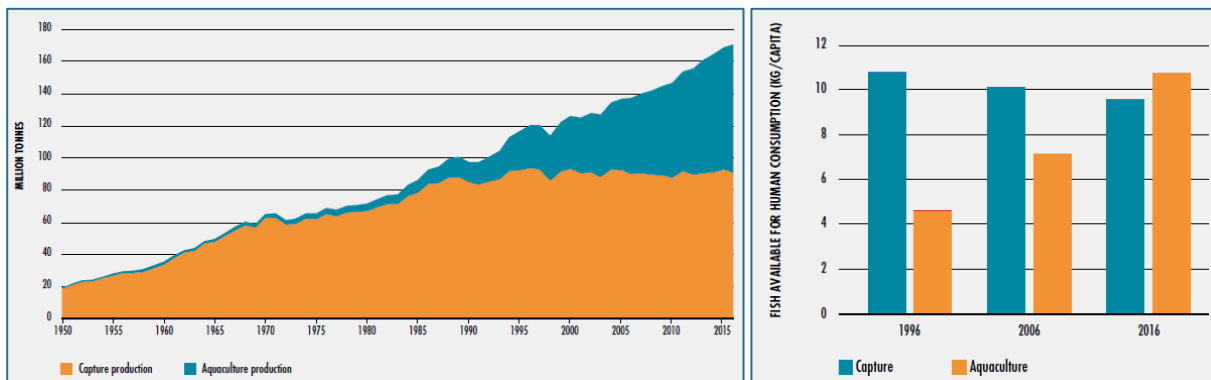


Figure 1 : Production mondiale de pêches et d'aquaculture (graphique de gauche), Contribution relative des pêcheries d'aquaculture et de capture aux poissons pour la consommation humaine (graphique de droite). Source : (FAO, 2018).

En effet, l'aquaculture continue de croître plus vite que les autres principaux secteurs de la production alimentaire, même si elle ne bénéficie plus des taux de croissance annuels élevés des années 1980 et 1990 (11,3 % et 10 %, plantes aquatiques exclues). La croissance annuelle moyenne est tombée à 5,8 % sur la période 2000-2016, même si une croissance à deux chiffres a encore été observée dans un petit nombre de pays, en particulier en Afrique entre 2006 et 2010. L'ensemble de la production mondiale aquacole s'élevait à 80 millions de tonnes de poisson, dont 54 millions de tonnes de poisson, 17 millions de tonnes de mollusques,

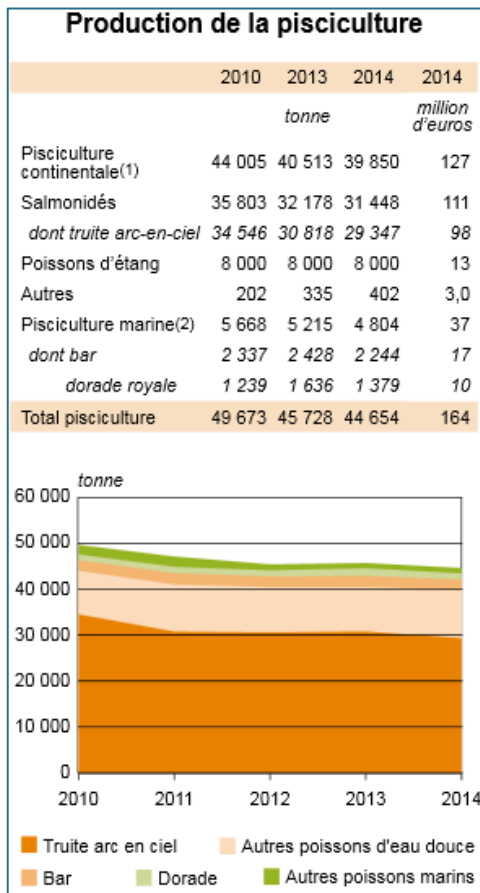
8 millions de tonnes de crustacés et 1 million de tonnes d'autres animaux aquatiques. La Chine est de loin le principal producteur de poisson d'élevage, et produit plus que le reste du monde chaque année depuis 1991. Les autres principaux producteurs en 2016 étaient l'Inde, l'Indonésie, le Viet Nam, le Bangladesh, l'Égypte et la Norvège. Les pays asiatiques contribuent donc à la quasi-totalité de cette production, soit 89 % de la production sur les deux dernières décades, comme le montrent les chiffres du **Tableau 1** (FAO, 2018). Parmi les espèces halieutiques d'élevage, le poisson constitue la catégorie principale, très loin devant celle des crustacés et des mollusques. Les espèces d'élevage les plus produites sont les carpes, et le Tilapia, représentant environ la moitié du poisson d'élevage.

Tableau 1: Production aquacole des principaux groupes d'espèces de poisson pour l'alimentation et par continent, en 2016 (en milliers de tonnes, équivalent-poids vif). Source: traduit de (FAO, 2018).

<i>Catégorie</i>	Afrique	Amérique	Asie	Europe	Océanie	Monde
<i>Aquaculture en eaux intérieures</i>						
<i>Poissons</i>	1 954	1 072	43 983	502	5	47 516
<i>Crustacés</i>	0	68	2 965	0	0	3 033
<i>Mollusques</i>			286			286
<i>Autres espèces aquatiques</i>		1	531			531
<i>Sous-total</i>	1 954	1 140	47 765	502	5	51 367
<i>Aquaculture marine et côtière</i>						
<i>Poissons</i>	17	906	3 739	1 830	82	6 575
<i>Crustacés</i>	5	727	4 091	0	6	4 829
<i>Mollusques</i>	6	574	15 550	613	112	16 853
<i>Autres espèces aquatiques</i>	0		402	0	5	407
<i>Sous-total</i>	28	2 207	23 781	2 443	205	28 664
<i>Aquaculture tout type confondu</i>						
<i>Poissons</i>	1 972	1 978	47 722	2 332	87	54 091
<i>Crustacés</i>	5	795	7 055	0	7	7 862
<i>Mollusques</i>	6	574	15 835	613	112	17 139
<i>Autres espèces aquatiques</i>	0	1	933	0	5	939
<i>TOTAL</i>	1 982	3 348	71 546	2 945	210	80 031

1.1.3 La France, troisième producteur en Europe

En Europe, l'aquaculture en 2010 représentait une production d'environ 2 520 000 tonnes pour seulement 4 % de la production aquatique animale mondiale). La France avec 224 000 tonnes se trouve en 4^{ème} position, très loin derrière la Norvège (1^{er} producteur mondial de saumon) et juste au niveau de l'Espagne et du Royaume-Uni (2nd et 3^e producteurs européens).



Si la production norvégienne continue régulièrement de progresser, celle de la France stagne (Ifremer, Source FAO 2012, données 2010). Ainsi, la valeur des importations en France de produits aquatiques augmente de 7 % en un an. Parmi ceux-ci, les achats de poissons frais ou congelés (entiers et filetés) croissent de 13 % tandis que les préparations et conserves de poissons diminuent de 5 %. La part consommée de poisson d'élevage par les Français représente seulement 11 % du poisson consommé (FranceAgriMer, 2018). En France, la production de produits aquatiques ne couvre que partiellement la consommation. Parmi les principales espèces dont la balance est excédentaire, deux viennent pour partie ou totalement de l'élevage : la truite et les huîtres. La truite arc-en-ciel (**Figure 2**) est l'espèce far de l'élevage en France, très appréciée des pêcheurs pour le loisir et la consommation.

Figure 2 : La pisciculture en France de 2010 à 2014. Source: <http://agreste.agriculture.gouv.fr>

Des données plus récentes indiquent que la France, en tant que troisième producteur européen de truites élevées en eau douce, a produit près de 33 000 tonnes en 2018, démontrant une tendance à la hausse de la production (Agreste, 2018).

1.2 Des maladies aquacoles aux résidus de médicaments

Avec plus d'un tiers de la production mondiale de poisson commercialisée à l'échelle internationale, l'assurance de la qualité et de l'alimentation est devenue un problème majeur. L'activité aquacole a connu un essor fulgurant au cours des trois dernières décennies, imposant de faire face à des challenges importants, en particulier dans le contrôle des pathogènes responsables des maladies infectieuses qui limitent actuellement la poursuite de l'intensification.

1.2.1 La production intensive aquacole : source de stress

Le processus d'intensification de l'élevage animal tel que celui opéré pour les animaux de rente et pour les volailles au cours du XXème siècle, a fait face aux problèmes inhérents à cette approche productiviste (génétique, reproduction, nutrition, santé animale..). Aujourd'hui l'aquaculture doit à son tour s'adapter. Les maladies les plus courantes affectant l'aquaculture sont causées par une multitude d'agents pathogènes bactériens, fongiques ou viraux. Ces maladies sont particulièrement courantes chez les poissons soumis à un stress chronique. Les principales causes de stress peuvent être directement liées à des pratiques de manipulation inadéquates, à une eau et à des aliments de mauvaise qualité qui ne répondent pas aux besoins nutritionnels des différentes espèces de poissons. Ainsi, une alimentation de mauvaise qualité augmente les risques d'apparition de maladies associée à un taux de mortalité élevé. La densification des bancs de poissons au cours de l'élevage est un autre facteur de stress important en aquaculture (Rosa et al., 2020). Le degré de stress résultant de ces conditions conduit à des modifications des mécanismes biochimiques, physiologiques et comportementaux, amenant presque inéluctablement au déclenchement de maladies (**Figure 3**) (Pérez-Sánchez et al., 2018).

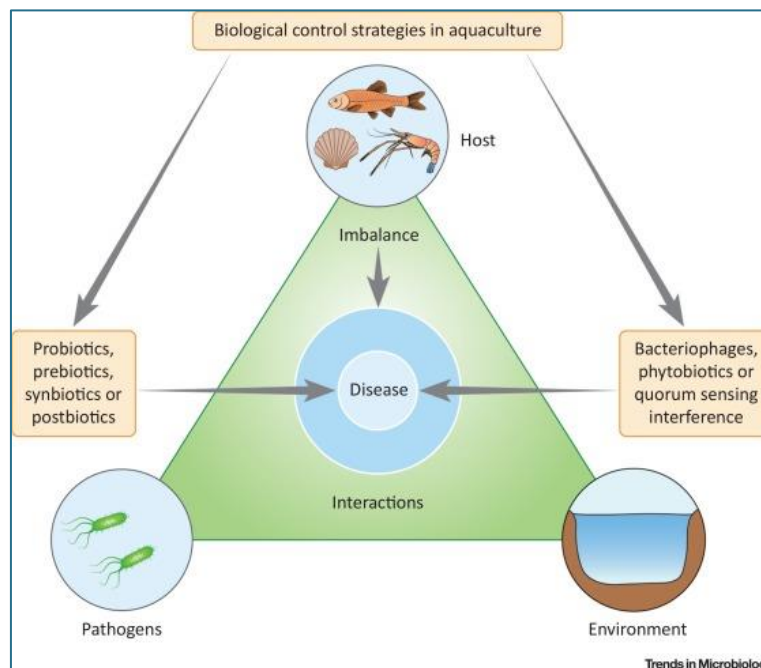


Figure 3 : Trouble pathogène-hôte. Les interactions de l'environnement mènent à la maladie. Source : (Pérez-Sánchez et al., 2018).

1.2.2 L'aquaculture affectée par une multitude de maladies

En aquaculture, jusqu'à 50 % des pertes de production sont causées par les maladies (Assefa and Abunna, 2018). Celles-ci proviennent essentiellement des infections bactériennes, notamment par les bactéries à gram négatif, constituant la source la plus importante de maladie dans les différents types de production. Les maladies fongiques constituent la deuxième source de pertes, en particulier dans l'élevage de crustacés et de salmonidés. Les parasites protozoaires externes sont également responsables de la perte d'un grand nombre de poissons et d'alevins et sont une cause d'épizooties chez les jeunes crustacés (Meyer, 1991). Comme nous l'avons vu précédemment, ce sont les facteurs de stress qui augmentent la susceptibilité aux processus infectieux causés par des agents pathogènes opportunistes tels que virus, bactéries, champignons et parasites (Lunestad and Samuelsen, 2008):

- Les **virus** peuvent incommoder les élevages aquacoles, mais ne font pas l'objet de traitement thérapeutique.
- De nombreuses espèces **bactériennes**, plus d'une centaine, ont été recensées comme facteurs de maladies dans les piscicultures d'eau douce et marines telles que les *Aeromonas*, les *Streptocoques*, les *Flavobactéries*, les *Vibrio*, ... etc.
- Certains champignons microscopiques peuvent affecter les élevages, telles que la saprolegniose (*Saprolegnia sp.*). Ces champignons représentent principalement un problème dans les élevages en eau douce et peuvent nécessiter un traitement antifongique des œufs de poisson ou des alevins.
- Les poissons sont les hôtes d'une multitude de **d'ectoparasites et d'endoparasites**. Ces parasites sont spécifiques de certains écosystèmes et ont généralement des effets limités sur la santé des poissons. Cependant, les parasites peuvent être un facteur aggravant dans des conditions stressantes et augmenter la morbidité. Par exemple, les poissons-chats exposés à un stress hydrique de 30 minutes avec un manque d'eau entraînaient environ 20 % de mortalité quand ils étaient exposés à *Edwardsiella ictaluri* par rapport aux poissons témoins (Bilodeau et al., 2005). Au Brésil, les parasites sont les agents pathogènes les plus étudiés dans la pisciculture brésilienne (Hashimoto et al., 2011). Ils affectent les deux espèces les plus représentées au Brésil, la carpe commune et le tilapia. Les poissons peuvent alors perdre du sang par les branchies et subir des nécroses qui entraînent une réduction du rythme respiratoire et une altération de la capacité de régulation.

1.2.3 Les traitements peuvent conduire à des résidus dans les aliments

Les conditions de stress telles que la forte densité piscicole, l'hypoxie (demande biochimique en oxygène non maîtrisée) ou les concentrations élevées en nitrites et en ammoniac contribuent à l'apparition de maladies et peuvent amener à des traitements médicamenteux.

↳ Les substances pharmacologiques utilisées

Les traitements thérapeutiques et prophylactiques en aquaculture incluent principalement les antibiotiques, les antiparasitaires, les anesthésiques et les désinfectants (Burrige et al., 2010). Les antibiotiques autorisés pour un usage en aquaculture au sein de l'Union Européenne sont listés dans le règlement CE 37/2010 (Commission Européenne, 2010) et incluent les tétracyclines, les pénicillines, les quinolones, les sulfamides et le triméthoprime (Oliveri Conti et al., 2015; Justino et al., 2016). Les antiparasitaires administrés, contre le pou du saumon par exemple, sont classés en deux groupes en fonction de leur voie d'administration, les traitements par balnéation et les additifs alimentaires. Les pyréthroïdes, le peroxyde d'hydrogène et les organophosphorés sont ou ont été administrés par des techniques de bain, tandis que les avermectines sont administrées comme additifs dans les aliments pour pisciculture.

Parmi ces produits thérapeutiques, un état des lieux de l'utilisation des antibiotiques publié en 2017, signale que 67 antibiotiques ont été utilisés dans 11 des 15 grands pays producteurs aquacoles mondiaux entre 2008 and 2018. Parmi ces pays, dont le Vietnam, la Chine et le Bangladesh, 73 % ont traité avec l'oxytétracycline, la sulphadiazine et le florfenicol (Lulijwa et al., 2019). Parmi ces 67 antibiotiques, 14 ont été détecté à des niveaux excédant les limites réglementaires, parmi lesquels les sulfamides étaient en tête de liste avec 43 % des composés reportés, suivis par les quinolones reportées à 36 %.

Certains antimicrobiens tels que le chloramphénicol, le vert de malachite (MG) et les nitrofuranes (par exemple, la furazolidone, la furaltadone, la nitrofurazone et la nitrofurantoïne) ont été interdits dans les pratiques d'aquaculture pour des raisons de sécurité des aliments. La réglementation sur MG et certains autres colorants à activité thérapeutique sera d'ailleurs abordée dans le paragraphe 2.1.

↳ La présence de résidus dans les produits d'aquaculture

Ainsi, les dérèglements liés aux conditions intensives d'élevage conduisent presque inévitablement aux maladies, bien souvent traitées au détriment d'une meilleure zootechnie par l'emploi d'un arsenal de produits chimiques à visée thérapeutique ou prophylactique. Les contaminants chimiques présents dans les élevages, intentionnellement ou non, peuvent être métabolisés puis excrétés par l'animal. Ils sont alors potentiellement détectables à **des niveaux résiduels** dans l'environnement aquacole ou accumulés dans le poisson. Les résidus qui resteraient présents dans la chair de poisson, peuvent poser des problèmes pour le consommateur de cette denrée alimentaire si les limites réglementaires établies pour le résidu de la substance chimique en question ne sont pas respectées.

La bioaccumulation de résidus de contaminants représente non seulement un risque potentiel pour la santé publique mais aussi pour l'équilibre et la santé de l'environnement. En effet, cette bioaccumulation peut devenir toxique dans les élevages et aux alentours pour les poissons, les bivalves, les crustacés et les mollusques, ainsi que pour certaines plantes. De plus, les contaminations peuvent être liées, non seulement aux traitements intentionnels, mais aussi à l'usage d'aliments commerciaux pour animaux dont les ingrédients peuvent contenir des résidus de médicaments vétérinaires, des polluants organiques persistants, des pesticides, ou encore des métaux (mercure, plomb, cadmium, chrome hexavalent, arsenic et sélénium). Les teneurs en résidus médicamenteux et en contaminants de l'environnement sont strictement contrôlées par les réglementations mondiales et européennes afin de définir les concentrations maximales acceptables de ces substances dans les produits alimentaires (poissons, coquillages, crustacés), provenant de l'aquaculture ou de la pêche (Justino et al., 2016).

1.3 Les résidus de colorants

Les colorants sont présents depuis la nuit des temps dans la vie de l'Homme. Ils ont d'abord servi comme moyen de communication, d'identification et d'expression, par les peintures rupestres et le maquillage. Puis la couleur a pris place progressivement pour teindre les vêtements, les voitures, les jouets ; pour colorer les bonbons, les fleurs, puis finalement les aliments de tous les jours. Ils sont devenus omniprésents dans l'industrie chimique tels que la cosmétique, le textile, et dans l'agroalimentaire. Pendant la première moitié du XXème siècle, certains colorants ont été découverts comme ayant des propriétés thérapeutiques.

1.3.1 Présentation des principales familles de colorants



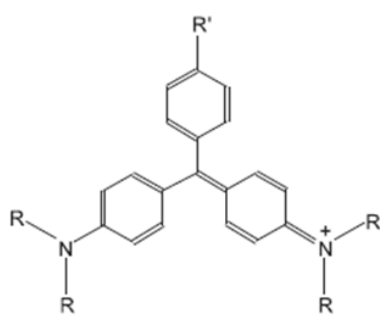
Parmi les colorants possédant une activité pharmacologique, les plus fréquemment utilisés en aquaculture appartiennent à la famille des triarylméthanés (TAMs), aux propriétés antifongiques, antiparasitaires, ou antimicrobiennes. Il existe d'autres familles dont certaines propriétés thérapeutiques sont communes aux TAMs tels que les xanthènes, les phénothiazines et les phénoxazines. De plus, il existe des produits dérivés des TAMs, tels que les colorants de la famille des victoria. En dehors de leurs propriétés antimicrobiennes, certains colorants peuvent présenter d'autres avantages. C'est le cas des dérivés phénylazoïques qui permettent l'intensification de la couleur naturelle de certains produits alimentaires (chair des poissons, œufs ...).

La plupart des colorants abordés dans cette thèse font partie du rapport scientifique publié par l'EFSA faisant l'objet d'une évaluation toxicologique afin d'anticiper un renforcement du dispositif de surveillance actuel si il s'avère nécessaire (EFSA et al., 2017a). Beaucoup de ces colorants sont encore méconnus tout du moins en ce qui concerne leur utilisation en aquaculture. Ils ont été évalués par l'EFSA quant-à leur toxicité afin d'en mesurer le risque pour la santé humaine en cas d'usage vétérinaire frauduleux ou d'occurrence dans l'alimentation (via l'environnement par exemple). Ils peuvent se répartir en plusieurs familles de composés :

Les triarylméthanés (TAMs) : Les TAMs sont parmi les plus anciens colorants fabriqués industriellement. Ils étaient initialement préparés par des méthodes découvertes empiriquement. La synthèse du MG a été obtenue en 1877 par O. Fisher à partir du benzaldéhyde et de la diméthylaniline par des procédés encore utilisés industriellement aujourd'hui (Gessner and Mayer, 2000). Leur force de coloration et de brillance leur confèrent en première intention des applications industrielles variées : teintures du papier, de fibres de coco et de jutes, et autres fibres à base de lignine ; fabrication des encres, coloration de détergents et de fertilisants, teintures de cuirs... ; ils peuvent être utilisés également comme agents de protection contre la transmission de certaines maladies humaines par transfusion (Duxbury, 1993). Le cristal violet (CV) aussi appelé violet de gentiane, et l'éthyl violet (EV), ont été aussi utilisés pour marquer la viande d'empreintes indélébiles (Reyns et al., 2014). Ils portent ainsi différents noms liés à leurs propriétés, comme le victoria pure blue bo également appelé basic blue 7 ou pigment blue 1 (Gessner and Mayer, 2000). Leur deuxième application est liée à l'industrie aquacole du fait de leurs puissantes propriétés antiseptiques et antiparasitaires (Foster and Woodbury, 1936).

Les TAMs se trouvent généralement sous leur forme cationique (TAM^+), car de nature très électrophile. Ce sont des hydrocarbures composés de trois cycles phényles reliés entre eux par un triple pont carbone. La présence de groupements chromophores et d'une forte délocalisation électronique fait de ces molécules des colorants vifs contrairement à leurs formes réduites incolores (**leuco-bases**). Ces molécules sont solubles dans les solvants organiques tels que le méthanol (MeOH) ou l'acétonitrile (ACN). Les molécules de la famille des TAMs varient par la substitution des groupements en position para des cycles benzéniques (

Figure 4). Les molécules de cette famille, étudiées lors de cette étude en particulier pour le développement de méthodes analytiques, sont le **Vert de Malachite (MG)**, le **Vert Brillant (BG)**, le **Cristal Violet (CV)** ainsi que la **Pararosanine (PRRA)** et l'**Ethyl violet (EV)**.



<i>Molécule</i>	<i>R=</i>	<i>R' =</i>	Formule brute	Masse molaire g/mol	Log P
<i>MG</i>	Me	H	$\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{ClN}_2$	364.9	0.62
<i>BG</i>	Et	H	$\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$	482.6	3.13
<i>CV</i>	Me	NMe_2	$\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{ClN}_3$	408.0	0.98
<i>EV</i>	Et	NEt_2	$\text{C}_{31}\text{H}_{42}\text{ClN}_3$	492.1	4.7
<i>PRRA</i>	H	NH_2	$\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{ClN}_3$	323.8	-0.21

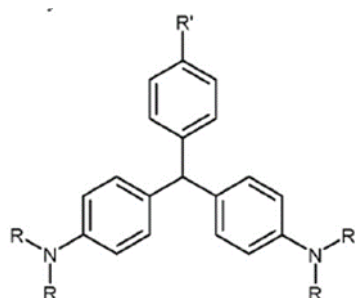
Figure 4 : Structure des TAMs

↳ **Propriétés physico-chimiques du MG** : Ce colorant cationique est constitué de cristaux verts à éclat métallique. Sa formule brute et son poids moléculaire sont donnés

Figure 4. MG est disponible sous différentes formes, principalement sous la forme d'oxalate ou de chlorhydrate, ou dissous dans une solution nominale à 50 % sous la forme d'un mélange de sel acétique et de chlorhydrate (Alderman, 1985). Sa couleur verte est indépendante de sa combinaison anionique avec le chlore ou l'oxalate. En plus des variations résultant de sels différents, les TAMs tels que MG peuvent exister sous deux formes ioniques: le sel colorant et le carbinol ou pseudobase (également appelée base colorante ou base carbinol). La plupart des réactions à l'équilibre ionique sont effectivement instantanées, mais les TAMs appartiennent à une gamme limitée de cations qui se combinent lentement avec des ions hydroxydes de manière covalente pour produire une pseudobase non ionisée. (Albert, 1958) souligne que les pseudobases de tels colorants ont une liposolubilité bien supérieure à celle du cation et indique que c'est probablement en tant que pseudobase que ces ions pénètrent dans les cellules. Selon

Goldacre et Phillips (Goldacre and Phillips, 1949), la constante d'ionisation du MG donne un pKa de 6,90. À pH 4, MG est ionisé à 100 %, à 50 % à pH 6,9, à 25 % à pH 7,4 et à 0 % à pH 10,1.

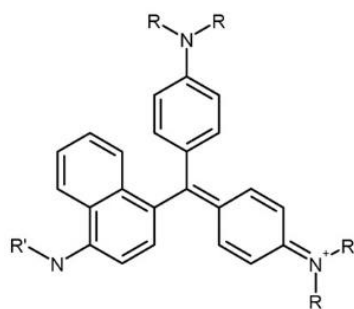
Métabolites des TAMs : Un métabolite est défini comme étant un résidu stable après transformation biochimique de la molécule mère principalement par le métabolisme. Le foie joue un rôle prépondérant dans le métabolisme animal. Si le métabolite est plus persistant dans l'organisme que la molécule mère, comme dans les tissus du poisson par exemple, il peut alors être considéré comme un résidu marqueur d'intérêt pour prouver un usage préalable du colorant. Les principales bio-transformations des TAMs sont de nature oxydo-réductives. Le métabolisme sera détaillé dans le sous-chapitre ci-après. Les principaux métabolites suivis comme résidus marqueurs d'un traitement par les TAMs ont été identifiés comme étant **leurs formes réduites encore appelées leuco-bases**. Les leuco-bases étudiées lors de notre projet (**Figure 5**) sont le **Leuco Vert de Malachite (LMG)**, le **Leuco Cristal Violet (LCV)** et le **Leuco Vert Brillant (LBG)**.



<i>Molécule</i>	R=	R'=	Formule brute	Masse molaire g/mol	Log P
<i>LMG</i>	Me	H	C ₂₃ H ₂₆ N ₂	330.5	5.7
<i>LBG</i>	Et	H	C ₂₇ H ₃₄ N ₂	386.5	/
<i>LCV</i>	Me	NMe ₂	C ₂₅ H ₃₁ N ₃	373.5	/

Figure 5 : Structure des métabolites réduits (leuco-bases) des TAMs

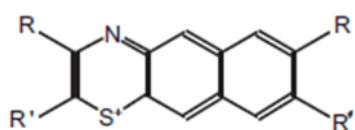
Les dérivés des TAMs: Les dérivés des TAMs (**Figure 6**) sont des hydrocarbures composés de 2 ou 3 cycles phényle et d'un cycle naphthyle issu de la substitution d'un phényle, donc de structure **triarylnaphtylméthane**. De par leurs propriétés proches de celles des TAMs, ils sont également utilisés dans l'industrie chimique pour colorer le papier, et dans le domaine de l'impression. Ils ont été décrit depuis très longtemps par Orland and McClure comme étant de très bons indicateurs colorés des réactions acido-basiques, de même que d'autres dérivés comme la Pararosanine et la Rhodamine B (Orland and McClure, 1959). Les molécules étudiées lors de cette étude, en particulier pour le développement de méthodes analytiques, sont le **Victoria Blue B (VBR)**, le **Victoria Blue R (VBR)** et le **Victoria Pure Blue BO (VPBO)**, étudié également pour son métabolisme chez le poisson.



<i>Molécule</i>	R=	R'=	Formule brute	Masse molaire g/mol	Log P
VBB	Me	Ph	C ₃₃ H ₃₂ ClN ₃	506.1	3.3
VBR	Me	Et	C ₂₉ H ₃₂ ClN ₃	458.0	2.1
VPBO	Et	Et	C ₃₃ H ₄₀ ClN ₃	514.1	4.1

Figure 6 : Structure des Victoria dérivés des TAMs

Les phénothiazines : Les phénothiazines (**Figure 7**) sont composés d'un cycle thiazine, comprenant un soufre et un azote, et de deux cycles benzéniques. Cette famille comprend le **Methylene Blue (MB)**, son métabolite principal l'**Azur B (AZB)** et le **New Methylene Blue (NMB)**. MB et AZB ne diffèrent que par la substitution d'un méthyle par un hydrogène sur un azote tertiaire. Il a été démontré que le MB peut conduire à l'obtention de l'AZB après avoir subi une dé-méthylation (Gessner and Mayer, 2000). MB manifeste des propriétés antiseptiques, et peut être utilisé pour traiter les infections parasitaires et fongiques. Il avait été synthétisé dès 1876 comme colorant dérivé de l'aniline pour l'industrie textile, puis des équipes scientifiques ont rapidement découvert son potentiel pour la coloration en microscopie. MB a été le premier composé de ce type à être administré à l'homme car il s'est avéré efficace dans le traitement du paludisme (Oz et al., 2011). Il a de ce fait été le premier colorant reconnu pour son applicabilité thérapeutique.



<i>Molécule</i>	R=	R'=	R''=	Formule brute	Masse molaire g/mol	Log P
MB	H	NMe ₂	NMe ₂	C ₁₆ H ₁₈ ClN ₃ S	319.9	0.75
AZB	H	NMe ₂	NHMe	C ₁₅ H ₁₆ ClN ₃ S	305.8	3.5
NMB	Me	NHEt	NHEt	C ₁₈ H ₂₂ ClN ₃ S	347.9	/

Figure 7 : Structure des Phénothiazines

Rhodamines : Les rhodamines font partie d'une famille de composés chimiques, les xanthènes, constitués de deux cycles benzéniques rattachés par un cycle pyrane. La FAO et la littérature scientifique ont associé les colorants xanthéniques à la question de la coloration illégale du saumon et de la pâte de poisson et à ses éventuelles conséquences toxicologiques (Reyns et al., 2014). Les rhodamines ont des propriétés antimicrobiennes similaires aux TAMs et sont fluorescents. Nous avons étudié ici la **Rhodamine 6G (RHG)** et la **Rhodamine B (RHB)** (**Figure 8**).

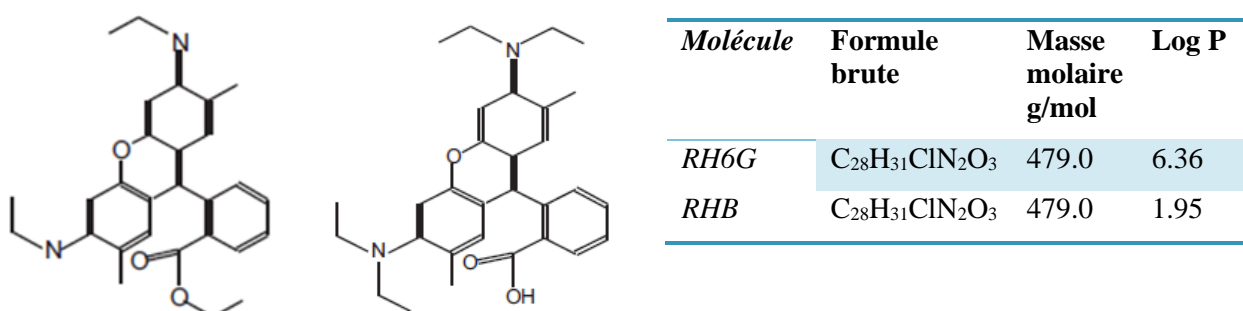


Figure 8 : Structure des Rhodamines (**RH6G** : à gauche, **RHB** : à droite)

Phénoxazines : Leur structure consiste en une oxazine fusionnée à deux cycles benzéniques. Ils sont peu résistants à la lumière, sont utilisés dans l'industrie du textile, notamment pour teindre les fibres acryliques. Le **Nile blue A (NBA)** (**Figure 9**) est utilisé pour la coloration en histologie. Les dérivés du Nile blue A ont été associés comme photosensibilisants potentiels dans la thérapie photodynamique des tumeurs malignes (Lin et al., 1991).

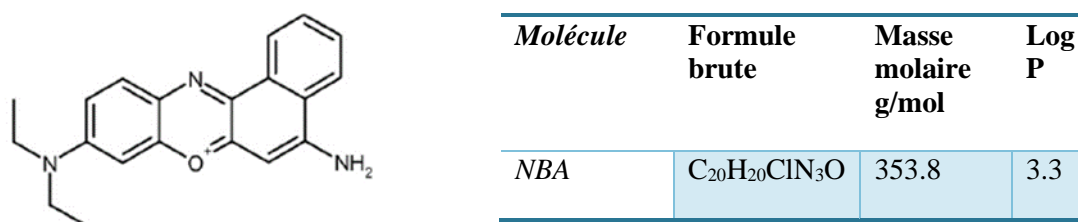


Figure 9 : Structure du Nile blue A de la famille des Phénoxazines

1.3.2 Efficacité et usages des TAMs en aquaculture

Outre leur application principale dans l'industrie chimique pour leurs propriétés colorantes, les TAMs, et essentiellement MG, ont été utilisés mondialement en aquaculture pour le traitement des infections parasitaires et fongiques chez le poisson et les crustacés. L'efficacité du MG en pisciculture a d'abord été reportée en 1933 par Foster et Woodbury (Foster and Woodbury, 1936). Leur mode d'action a été reconnu très tôt, et particulièrement leur puissante action antimicrobienne (Churchman and Herz, 1913). Leur activité est maximale contre les bactéries à Gram positif, mais plus réduite contre les bactéries à Gram négatif, les bactéries acido-résistantes et les spores bactériennes.

Des études *in vivo* sur le rat ont révélé que la puissante activité antimicrobienne du MG provenait de son interaction sur les systèmes NAD/NADH et FAD/FADH, et agissait donc comme un poison des enzymes de la chaîne respiratoire mitochondriale (Werth and Boiteux, 1968). Aussi la popularité du MG est liée à son large spectre d'action antimicrobienne comme énoncé précédemment, et à son efficacité dans la prévention et le traitement de certains types de maladies du poisson, comparés aux autres substances chimiques à disposition (Alderman, 1985; Halme et al., 2007).

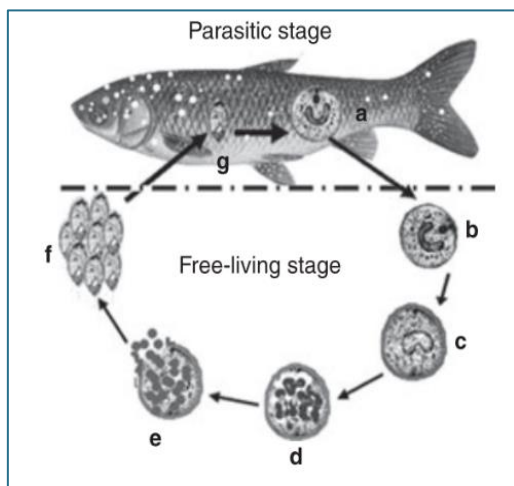
↳ Utilisation comme antifongique

Les colorants de structure arylméthane ont un large spectre d'activités antifongiques (Alderman, 1982), et d'ailleurs MG s'est avéré être le fongicide le plus efficace parmi 49 composés testés contre un champignon oomycète (Campbell et al., 2001). Il prévient efficacement la prolifération de ce champignon sur les poissons et leurs œufs, à la fois comme thérapie post-infection et en prophylaxie. Ces oomycètes, des eucaryotes filamenteux, sont responsables de la maladie « saprolégniose » (*Saprolegnia spp.*) chez les poissons d'eau douce et leurs œufs (**Figure 10**) et peuvent provoquer d'autres infections fongiques chez les crustacés marins. La saprolégnose a également été efficacement contrôlée par MG chez le saumon, le poisson-chat et la truite arc-en-ciel (Srivastava et al., 2004). Les effets du formol, du MG et de divers mélanges des deux substances, ainsi que ceux de différentes durées de baignation sur la croissance et la survie des souches de ces champignons ont été étudiés en détail par Olah et Farkas (Oláh and Farkas, 1978).



Figure 10 : La « mycose du poisson » décime les truites de la Touvre. Source : Par charentelibre.fr, publié le 26 mars 2018

↳ Utilisation comme antiparasitaire



Dans les années 1950, MG a d'abord été utilisé comme antiseptique contre les parasites internes et externes (Wu et al., 2007). Puis dans les années 1960, MG s'est avéré le traitement le plus efficace contre les ectoparasites à protozoaires, en particulier *Ichthyophthirius multifiliis*, engendrant la maladie des points blancs ou White spot disease. La maladie des points blancs survient aussi bien chez les poissons sauvages que chez les poissons d'élevage (Figure 11). Elle a d'importantes conséquences économiques.

Figure 11 : Le cycle de vie d'*Ichthyophthirius multifiliis*. Les différents stades du parasite jusqu'à l'envahissement de l'épithélium de son hôte. Sous la ligne pointillée se trouve le stade de la vie libre, au-dessus le stade parasite. Source: (Wei et al., 2013)

En effet, sans traitement préventif, elle peut entraîner une mortalité élevée chez les poissons juvéniles et adultes, comme par exemple au Pérou avec la perte de 18 millions de poissons en 1988 dans le Lac Titicaca (Wurtsbaugh and Tapia, 1988). La maladie des points blancs avait été signalée pour la première fois dans une ferme piscicole finlandaise au milieu des années 1970, tuant plus de 80,000 saumons en 1978 (Rintamäki-Kinnunen et al., 2005).

MG est également efficace sur une autre maladie appelée maladie rénale proliférative des salmonidés, et causée par un parasite myxozoaire de la famille des cnidaires (Clifton-Hadley and Alderman, 1987; Hedrick et al., 1993).

↳ MG surtout administré par balnéation

La plupart du temps, les traitements sont réalisés par balnéation dans des cuves ou bassins avec des durées curatives plus ou moins longues (de quelques heures à quelques jours) et des doses variables de l'ordre du ppm (Alderman, 1985). La **Figure 12** représente un traitement d'un bassin d'aquaculture au MG. En République tchèque, MG a été le plus souvent utilisé pour traiter les cas impliquant certains parasites (*Ichthyobodo necator*, *Trichodina sp.*, *Trichodinella sp.*, *Chilodonella sp.* et *Ichthyophthirius multifiliis*), et les cas d'infections fongiques cutanées du poisson et des œufs de poisson. Un bain avec MG sur une courte période a également été recommandé comme traitement de la flavobactériose des branchies chez les salmonidés (Sudova et al., 2007).

Dans de rares cas, MG peut être administré aux poissons via leur alimentation. Par exemple, MG a également été utilisé comme fongicide administré dans la farine de poisson et sa présence dans certains aliments commercialisés pour les poissons a été démontrée (Conti et al., 2015).

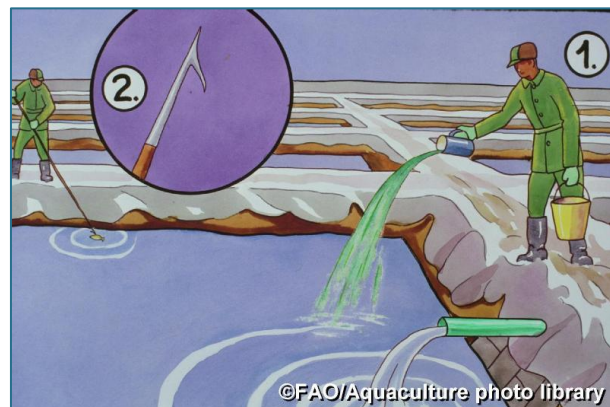


Figure 12 : Traitement d'un bassin d'aquaculture au MG et enlèvement de poissons morts. Source : FAO, <http://www.fao.org/fishery/photolibrary/home/en/>

↳ Peu d'études sur les propriétés thérapeutiques des TAMs autres que MG

L'efficacité thérapeutique des autres TAMs a été assez peu étudiée. Les propriétés thérapeutiques d'un panel de colorants ont été évaluées par Alderman en 1982. L'équipe développa des tests *in vitro* afin de tester l'efficacité de substances thérapeutiques contre les champignons parasites des poissons (Alderman, 1982). Ces études *in vitro* ont porté sur les effets de 11 TAMs ainsi que de quelques autres composés aux propriétés antifongiques qui ont été appliqués à des cultures de *Saprolegnia parasitica*. Parmi les 40 composés étudiés, le thimérosal, composé contenant du mercure, ainsi que les colorants MG, CV et BG, la monophénylrosaniline (Dahlia) et le vert iodé se sont avérés les plus efficaces. Le tableau ci-

dessous (**Tableau 2**) représente le % d'inhibition du parasite en contact avec différentes concentrations des colorants inclus dans cette thèse. RHB et le Victoria blue 4R présentent un effet à 10 ppm, alors que EV commence à être efficace à partir de 1 ppm. CV, BG et MG agissent déjà efficacement à 1 ppm.

Tableau 2 : Effets antifongiques de colorants étudiés par le protocole 1 ⁽¹⁾. Source : (Alderman, 1982)

<i>Colorant</i>	Croissance en % par rapport au contrôle		
	A 1 ppm	A 10 ppm	A 100 ppm
<i>Rhodamine B (RHB)</i>	100	16	0
<i>Victoria blue 4R</i> ⁽²⁾	100	7	0
<i>Ethyl violet (EV)</i> ⁽²⁾	21	0	0
<i>Crystal violet (CV)</i> ⁽²⁾	0	0	0
<i>Brilliant green (BG)</i> ⁽²⁾	0	0	0
<i>Malachite green (MG) oxalate</i> ⁽²⁾	0	0	0

(1) Protocole 1: L'organisme sélectionné était *Saprolegnia parasitica* CBS 302.56. Test d'inhibition sur des disques inoculés sur des plaques d'agar incubées à 16°C pendant 24h.

(2) Colorants Arylméthanes

Dans une étude plus récente (Oros et al., 2002), l'activité fongicide de 10 colorants de formule « triaryl » et de six composés de référence antifongique a été déterminée sur 36 souches fongiques. L'objectif de l'étude était d'examiner l'impact de ces colorants industriels lorsqu'ils sont rejetés dans l'environnement, et leur possible interaction avec la biologie des sols. La matrice de données a été évaluée séparément par analyse en composantes principales (ACP) et par technique de cartographie spectrale. Les propriétés antifongiques du MG, du CV, du BG ont notamment été évaluées. À partir de ces données, il a été déduit que les colorants « triaryl » présentent une activité antifongique comparable ou supérieure à celle des étalons antifongiques de référence; par conséquent, ils peuvent être considérés comme des polluants environnementaux lorsqu'ils sont accumulés dans les eaux souterraines et dans le sol.

⇒ Il n'existe pas de données connues d'usages en aquaculture pour ce panel de colorants et encore moins d'indications thérapeutiques de balnéation, mais la présence de résidus de certains colorants dans les poissons prouve qu'ils sont occasionnellement utilisés, même si leur utilisation reste très en marge de celle du MG. Dans le prochain chapitre, nous allons aborder le devenir de ces substances dans l'organisme, en particulier les TAMs, et leurs effets délétères.

1.3.3 Métabolisme et Toxicité des TAMs

1.3.3.1 Métabolisme

Les études **ADME** (Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion) s'intéressent au devenir du médicament dans l'organisme, ou celui d'autres composés extérieurs à l'organisme, encore appelés **xénobiotiques**. L'ensemble de ses paramètres ADME va conditionner sa toxicité, sa vitesse d'élimination et son profil métabolique.

↳ Définitions des paramètres ADME

- **Absorption** : L'absorption est le processus par lequel les molécules médicamenteuses accèdent à la circulation sanguine depuis le site d'administration du médicament. La vitesse de ce processus (le taux d'absorption du médicament) et son exhaustivité (le degré d'absorption du médicament) dépendent de la voie d'administration. L'absorption est la résultante de deux phénomènes: la résorption (passage membranaire) et les effets de premier passage (biotransformation métabolique survenant entre l'administration et la distribution générale). L'absorption est souvent incomplète après administration orale (médicaments dénaturés par l'acide gastrique ou liés aux aliments par exemple). La proportion d'une dose qui atteint la circulation systémique indemne est connue comme la biodisponibilité du médicament.
- **Distribution** : La distribution est le processus par lequel les médicaments se déplacent dans le corps. Après être entrées dans le sang, les molécules médicamenteuses doivent traverser les parois capillaires pour pénétrer dans les tissus, atteindre les membranes cellulaires et pénétrer dans les cellules.
- **Métabolisme** : Le métabolisme (**Figure 13**) est le processus par lequel les médicaments sont modifiés chimiquement d'une forme liposoluble appropriée pour l'absorption et la distribution à une forme plus soluble dans l'eau qui convient à l'excrétion. Le processus élimine efficacement le médicament parent. Le métabolisme des médicaments se déroule en deux phases:
 - **La Phase I**, dite de fonctionnalisation, au cours de laquelle les molécules du médicament sont modifiées chimiquement (par oxydation, réduction ou hydrolyse) pour les rendre adaptées aux réactions de phase II ou à l'excrétion. L'oxydation est de loin la

forme la plus courante de réaction de phase I et implique principalement des membres de la famille des enzymes du cytochrome P450 (CYP450), localisées à la surface du réticulum endoplasmique lisse des cellules hépatiques. Les métabolites produits sont plus hydrophiles que le composé d'origine et peuvent être rejetés par les transporteurs (par exemple la glycoprotéine P), ou encore biotransformés par les enzymes de phase II.

- **La Phase II**, dite de conjugaison, pendant laquelle des molécules de métabolite de phase I (ou, dans certains cas, de médicament inchangé) se combinent avec un substrat endogène pour former un conjugué inactif qui est beaucoup plus soluble dans l'eau que le métabolite de phase I. Cette conjugaison favorise l'hydrophilie de la molécule puis son excrétion via la bile et l'urine. Les réactions de phase II comprennent la synthèse de glucuronides ou de sulfates, l'acétylation ou la méthylation et la conjugaison avec le glutathion (GSH) grâce à des enzymes spécifiques (glutathion-S-transférases ou GST, UDP glucuronosyltransférases ou UGT...).

Le taux de métabolisme des médicaments varie considérablement d'un individu à l'autre, influencé par des facteurs génétiques et environnementaux. C'est la principale raison des différences interindividuelles dans la concentration plasmatique de certains médicaments après une dose standard, ce qui entraîne une grande variation de la réponse médicamenteuse.

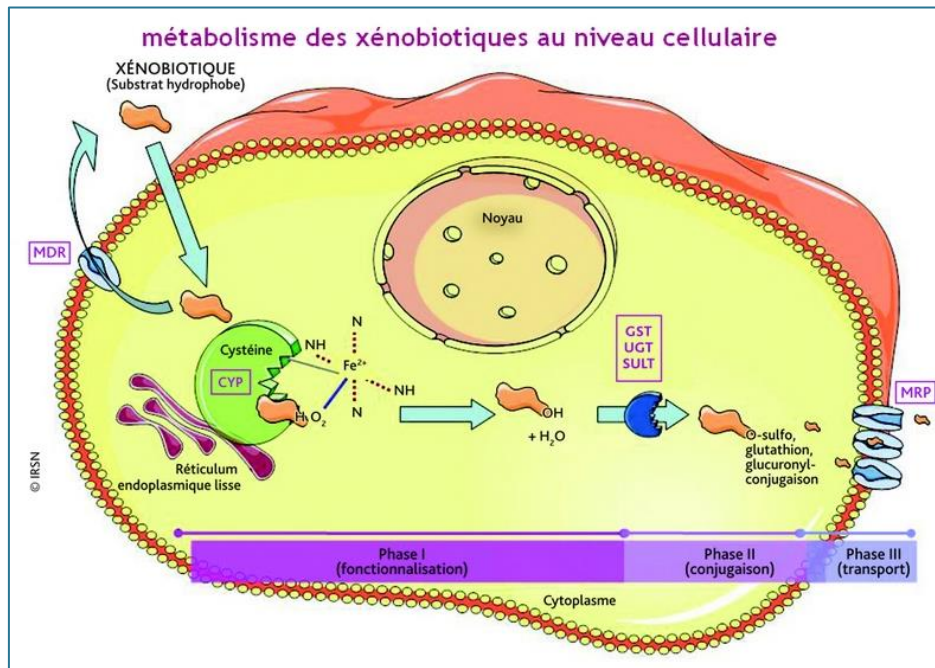


Figure 13 : Les différentes étapes du métabolisme des xénobiotiques. Source : <https://www.irsn.fr/FR/Larecherche/publications-documentation/aktis-lettres-dossiers-thematiques/envirhom/xenobiotique/Pages/xeno1.aspx#.XhCkCETLS70>

- **Excrétion** : Enfin, l'excrétion ou phase III du métabolisme, est le processus par lequel les médicaments et leurs métabolites sont éliminés du corps. Ils peuvent être excrétés par les fluides (principalement l'urine et la bile), les solides (fèces) ou les gaz (air expiré).

⇒ Lors de cette étude, nous nous sommes intéressés particulièrement à l'étape de métabolisme, afin de se focaliser sur les résidus marqueurs pour le contrôle réglementaire, et donc au devenir et à la persistance des colorants et de leurs métabolites.

↳ Découverte de LMG *in vivo*

Les principales réactions de biotransformation subies par MG sont de nature réductrice et oxydative. La plupart des résidus du MG dans les tissus des poissons se trouvent sous forme réduite de LMG, stockée dans les tissus et excrétée lentement. Ce métabolite est connu et donc utilisé depuis plusieurs dizaines d'années comme marqueur pour contrôler l'utilisation illégale du MG (Srivastava et al., 2004; Arroyo et al., 2009). L'intérêt pour ce leuco métabolite a démarré par des observations *in vivo* dans les années 80. Poe et Wilson (1983) ont pour la première fois signalé des résidus de MG et LMG dans les tissus des poissons. En effet, MG est immédiatement absorbé par les poissons et métaboliquement réduit en LMG, un composé non polaire et incolore, qui persiste dans les tissus (Poe and Wilson, 1983).

↳ Les conditions expérimentales modifient le métabolisme du MG

La persistance des résidus de MG et LMG dans le poisson dépend de l'espèce et de la taille du poisson, de la concentration et de la durée d'exposition au MG et des conditions environnementales, notamment la température et le pH du bassin aquacole. Dans l'étude d'Alderman et Clifton-Hadley chez la truite, les auteurs ont étudié l'influence de la température, à 8°C et 16°C, sur l'absorption, la distribution et l'élimination du MG. Le pH a été fixé précisément lors de cette étude à 7.6 afin que MG soit converti en forme carbinol à 95 % après un équilibre réalisé pendant 15 h en solution et avant démarrage du traitement. Des temps de demi-vie ($t_{1/2\beta}$) de 0.62 jours (8°C) et 14.5 jours (16°C) ont été respectivement estimés concernant l'élimination du MG dans le sérum de truite après exposition à 1.6 mg/L pendant 40 min. Dans les tissus, comme le muscle, les demi-vies de distribution et d'élimination sont plus longues avec la température de 16°C (Alderman and Clifton-Hadley, 1993).

↳ LMG se stocke dans les tissus, les organes foie et rein plus exposés

LMG est généralement reconnu en tant que principal métabolite du MG et cela dans divers tissus animaux (Roybal et al., 1995; Plakas et al., 1996). Il est principalement stocké dans le sérum, le foie, les reins, les muscles, la peau et les viscères de divers vertébrés, y compris chez les poissons (Clifton-Hadley and Alderman, 1987; Alderman and Clifton-Hadley, 1993; Máchová et al., 1996). Plakas et al (Plakas et al., 1996) ont déterminé les concentrations en MG dans la bile et 8 différents tissus chez le poisson-chat après une exposition en balnéation radiomarquée au ^{14}C -MG (0.8 mg/L pendant 1 h). Les concentrations maximales atteintes dans les tissus sont présentées dans le **Tableau 3**, mettant en évidence une prédominance respectivement dans la bile, le foie, la graisse, et les reins dans l'ordre décroissant. LMG est également le résidu marqueur chez le poisson à un stade précoce de développement, pour les œufs et les alevins, et donc l'objet de développements de méthodes dans ces différentes matrices biologiques (Allen et al., 1994).

Tableau 3 : Concentrations maximales atteintes de résidus radioactifs dans différents fluides et tissus biologiques. Source : (Plakas et al., 1996).

<i>Tissus</i>	Concentration maximale atteinte (mg équivalent MG/kg ou /L)	Temps atteint pour la concentration maximale (h)
<i>Bile</i>	101±41.2	24
<i>Foie</i>	33.4±7.45	0
<i>Graisse</i>	30.3±6.39	168
<i>Haut reins</i>	24.6±4.86	0
<i>Bas reins</i>	22.0±5.38	0
<i>Rate</i>	10.9±2.49	0
<i>Plasma</i>	6.36±1.51	0
<i>Peau</i>	3.99±0.68	0
<i>Muscle</i>	3.18±0.72	0

↳ Une absorption rapide et un stockage long de LMG

Le rôle joué par les branchies dans l'absorption du MG et l'ampleur de la conversion du MG en LMG indiquent que la réduction pourrait également se produire non seulement par voie métabolique, mais aussi directement dans les tissus par oxydo-réduction spontanée selon les conditions physico-chimiques. D'ailleurs, il a été observé qu'inversement, le LMG métabolisé dans le muscle du poisson pouvait se réoxyder en MG lorsque le muscle du poisson était congelé (Poe and Wilson, 1983).

Chez les poissons traités, MG est rapidement éliminé par l'animal tandis que LMG représente la forme prédominante dans les tissus consommés où il peut s'accumuler et persister longtemps en raison de son taux d'excrétion très lent. En effet, la lipophilicité du LMG augmente son temps de résidence dans les tissus adipeux. Dans l'étude de Plakas et al. (Plakas et al., 1996) sur le poisson-chat décrite dans le paragraphe précédent, les résidus du MG se sont bioaccumulés dans les tissus à des concentrations plus élevées que celle du bain d'exposition. Les concentrations moyennes en MG et LMG dans le muscle indiquées sur la **Figure 14** ci-dessous sont révélatrices.

Immédiatement après l'exposition, la concentration de résidus de LMG était légèrement supérieure à celle du MG dans le muscle. Après 14 jours, MG atteignait la limite de détection de la méthode, alors que les concentrations en LMG dans le muscle étaient plus de 40 fois supérieures. LMG était encore quantifiable dans le muscle 42 jours plus tard.

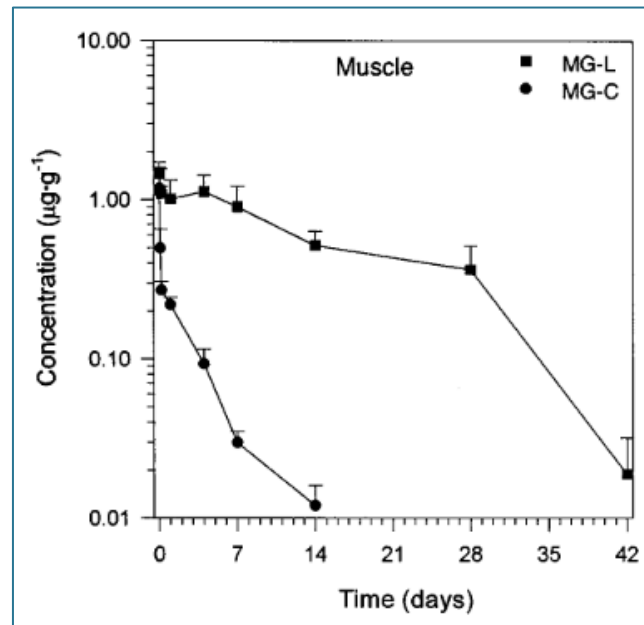


Figure 14 : Concentrations moyennes dans le muscle de poisson-chat en MG (MG-C) et LMG (MG-L) après exposition dans l'eau au MG (0.8 mg/L pendant 1 h). Source : (Plakas et al., 1996).

Jiang et al. (Jiang et al., 2009) ont montré un effet similaire concernant l'absorption rapide du MG et l'élimination lente du LMG. Ils indiquent que l'absorption du MG s'est produite pendant l'exposition et que les concentrations en MG dans les branchies de trois espèces de poissons d'eau douce (*P. pekinensis*, *C. auratus*, *O. argus*) ont toutes atteint un maximum pendant les 20 premières minutes d'exposition (6 mg/L de MG pendant 20 min). Les concentrations de MG dans le sang ont également atteint un maximum au tout début de l'exposition tandis que la concentration maximale de LMG a été atteinte entre 2h et 4h. Après cette période, les concentrations de MG et LMG ont rapidement chuté dans le sang (dessous 0.15 µg/mL). Pourtant les niveaux de concentration de MG et LMG dans le muscle étaient toujours supérieurs à 0,002 mg/kg à 240 h et pouvaient persister pendant 10 jours au maximum, avec une concentration en LMG supérieure à celle de MG et dépendante de la teneur en lipides des tissus. Il a été déduit que la plupart du MG a été rapidement converti en LMG chez le poisson, opérant une dépuración lente dans les tissus adipeux, la peau et les gonades.

L'effet du temps d'exposition a été démontré par Bajc et al. (Bajc et al., 2011), plus récemment par une étude d'absorption, d'accumulation et de dépuración dans le muscle et la peau de la truite arc-en-ciel et de la carpe. La truite arc-en-ciel a été exposée à 1 mg/L de MG pendant 1 ou 3 h ou à 1,5 mg/L pendant 1 h. L'augmentation de la dose n'a pas eu d'incidence significative sur les niveaux de résidus chez la truite arc-en-ciel (0,45 et 0,53 mg de MG/kg dans les groupes 1 et 1,5 mg/L, respectivement); cependant, la durée d'exposition a eu une influence majeure.

La truite arc-en-ciel exposée trois fois plus longtemps contenait 4,5 fois plus de MG (2,1 mg/kg) et deux fois plus de LMG (6,0 mg/kg) un jour après l'exposition par rapport à la truite traitée en balnéation d'une heure (0,45 mg de MG/kg et 2,8 mg de LMG/kg). La concentration de LMG chez la truite exposée à 1 mg de MG/L pendant 3 h a continué d'augmenter après la suppression du traitement, atteignant jusqu'à 9,7 mg de LMG/kg après 4 jours. Le niveau de MG chez la truite arc-en-ciel a diminué rapidement et, un jour après le traitement, environ 74 % du total des résidus se trouvait sous leuco-forme. La déplétion de LMG a ensuite été environ trois fois plus longue pour le groupe exposé pendant 3h comparé au groupe exposé une heure.

↳ Quelques études réalisées *in vitro* : métabolisme chez les champignons

Les systèmes *in vitro* permettant de déterminer les principaux métabolites de colorants pharmacologiquement actifs ont été peu utilisés. Les réactions métaboliques avec les enzymes de champignons ont toutefois été observées il y a plusieurs dizaines d'années. La biodégradation du CV ainsi que plusieurs autres TAMs, tels que PRRA, le rouge de crésol, le bleu de bromophénol, EV, MG, et BG, a été mise en évidence par le système enzymatique de la lignine du champignon *Phanerochaete chrysosporium* (Bumpus and Brock, 1988). La disparition du CV a engendré l'apparition de métabolites successivement déméthylés. Ce système de dégradation, contenant des peroxydases, se met en place sous certaines conditions comme un apport en azote excessif ou un manque de nutriments.

La réduction d'oxydoréduction, première réaction métabolique bien connue des TAMs, a par exemple été observée sous la forme d'une biotransformation *in vitro* formant du leuco-MG dans le champignon *Cunninghamella elegans* (Cha et al., 2001). Bien que ces études aient signalé le métabolisme fongique des TAMs, leur réduction par la microflore intestinale a aussi été démontrée par les bactéries commensales de mammifères (rat, souris, singe, homme) (Singh et al., 1994; Henderson et al., 1997).

Plus récemment, des sous-fractions de foie de truite arc-en-ciel ont permis d'évaluer les effets *in vitro* de MG et LMG sur certaines enzymes métabolisant les médicaments (DME) et notamment l'implication du GSH. Les résultats ont suggéré que MG pourrait être un substrat du CYP1A et éventuellement d'autres CYP450, ce qui n'avait été démontré jusqu'à présent que dans les cultures du champignon *Cunninghamella elegans*. MG s'est avéré agir sur la quantité de GSH formé *in vitro* en formant des adduits. Il agit généralement en tant qu'inhibiteur des DME de foie de truite, notamment EROD et GST (Nebbia et al., 2017).

↳ D'autres métabolites identifiés de MG

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent, certaines études *in vitro* ont permis d'identifier préliminairement les métabolites principaux de certains TAMs par oxydo-réduction, comme des composés déméthylés. La détection de métabolites N-déméthylés et N-oxydés de MG et de LMG, incluant une arylamine primaire, dans les filets de poissons-chats traités au MG, a confirmé la présence d'une voie de biotransformation similaire chez les poissons (Doerge et al., 1998). Chez les mammifères également, les études *in vivo* (Culp et al., 1999) ont montré que la voie oxydative de MG ou LMG impliquait principalement la N-déméthylation séquentielle du colorant pour obtenir des dérivés mono-, di-, tri et tétra-déméthylés (**Figure 15**). Les résultats ont également suggéré la génération d'arylamines primaires et secondaires impliquées dans certains mécanismes génotoxiques.

En ce qui concerne le métabolisme de phase II, les données disponibles indiquent que MG subit une excrétion biliaire, éventuellement sous forme d'adduit au GSH. Bien que n'ayant pas été identifiés analytiquement, les autres TAMs formeraient également des adduits au GSH montrés par décoloration lors de différents ajouts de GSH et inhibant la GST (Debnam et al., 1993).

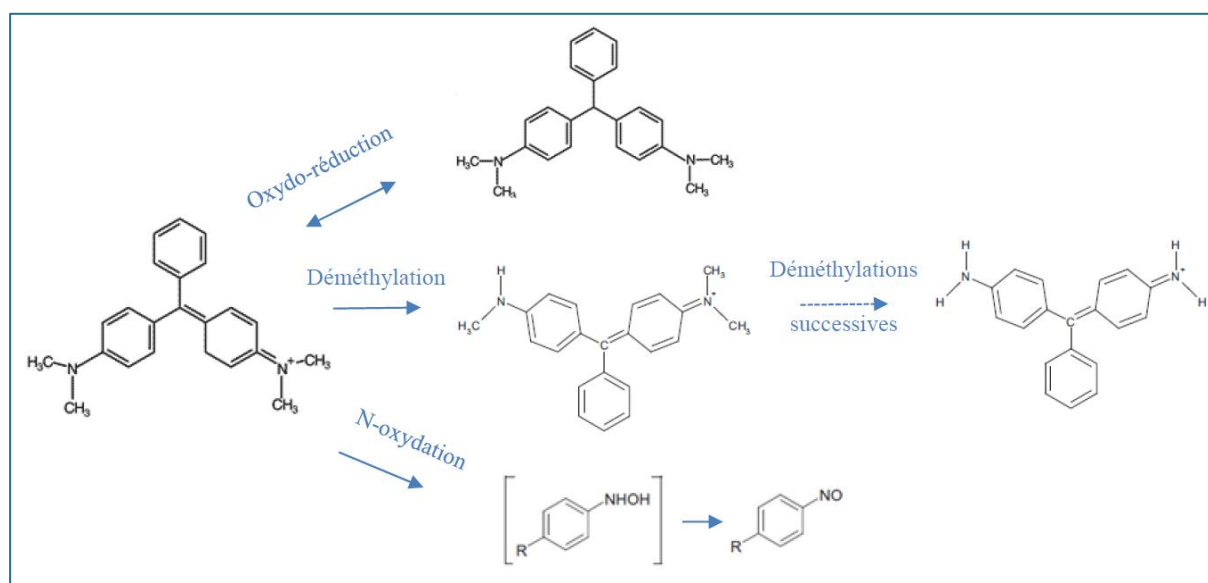


Figure 15 : Voies métaboliques connues du MG (muscle, foie ; mammifères, poissons).

↳ Un métabolisme similaire chez les autres TAMs

Les autres TAMs ont été beaucoup moins étudiés que MG mais quelques études disponibles vont dans le sens d'un métabolisme très proche entre les composés dérivés de cette famille. Comme nous l'avons vu ci-dessus, des réactions de biotransformation ont permis de mettre à

jour l'apparition de métabolites N-déméthylés sur des cultures de mycètes pour 7 triarylméthanés : MG, CV, PRRA, rouge crésol, bleu de bromophénol, EV, BG (Bumpus and Brock, 1988). La formation de ces composés déméthylés n'a pas été confirmée par des études *in vivo*.

Par contre, les leuco-bases ont été recherchées *in vivo* pour caractériser les métabolites marqueurs, notamment pour CV, BG, MB. LCV a été confirmé par de nombreuses études *in vivo* chez différentes espèces de poissons (Dowling et al., 2007; Lee et al., 2010; Chan et al., 2012). Les données concernant le métabolisme de BG sont plus limitées. Les résidus de BG et LBG ont été identifiés dans des échantillons de truites traitées dans un bain de BG. Immédiatement après l'exposition au bain, les résidus de BG et LBG étaient dans une proportion égale dans le muscle de truite. Deux heures après l'exposition, la concentration de résidus de LBG dans le muscle dépassait des deux tiers celle de résidus de BG (Hurtaud-Pessel et al., 2011). Cependant, LBG s'oxyde facilement en BG, ce qui limite les conditions physico-chimiques propres à stabiliser ce composé et entraîne l'absence de standard disponible dans le commerce. Cela limite les études analytiques permettant d'identifier et confirmer sa présence. Dans une autre étude, LBG n'a pas été identifié dans des échantillons de saumon, de poisson-chat et de tilapia ayant été exposés à un bain à faible concentration (10 µg/L) de BG et seul BG était parfaitement identifiable (Schneider and Andersen, 2015).

Ces études suggèrent que le composé parent BG serait un résidu marqueur acceptable pour détecter un traitement avec ce colorant, tandis que les tests réglementaires pour MG et CV doivent inclure la contribution des formes leuco, qui ont une plus grande stabilité que leur forme parentale et un temps de résidence plus long dans le muscle du poisson.

⇒ [Conclusion sur les métabolites des principaux triarylméthanés inclus dans cette thèse](#)

Les métabolites du MG ont largement été caractérisés, bien que certaines données complémentaires pourraient sembler nécessaires, comme une recherche plus approfondie de métabolites de phase II. Les leuco-formes semblent dominantes comme voie de biotransformation pour les triarylméthanés et ont donc été définies comme résidus marqueurs, sauf pour BG. Par contre, les dérivés de la famille des Victoria n'ont pas fait l'objet d'études de caractérisation de leurs métabolites.

1.3.3.2 Toxicité

L'étude de la toxicité d'un xénobiotique, substance étrangère à un organisme, se décline en différentes étapes que sont : l'identification et la caractérisation du danger, l'étude de l'effet dose-réponse et l'évaluation du risque. Un ensemble de tests *in vitro* et *in vivo* permettent de caractériser la toxicité d'un xénobiotique, de définir son mode d'action, les organes cibles, et les doses sans effets nocifs observables (NOAEL).

Nous avons vu dans le paragraphe précédent que MG surtout et certains TAMs, étaient rapidement absorbés dans l'organisme, se métabolisaient principalement en forme réduite leuco, et s'accumulaient sous cette forme dans les tissus de poisson pendant des semaines voire des mois. Une fois que les paramètres d'ADME sont connus, il est important de clarifier l'impact de nos colorants du point de vue toxicologique sur les organismes.

L'objet de cette partie sur la toxicité n'est pas de faire une revue exhaustive de la littérature mais de fournir les éléments clés des effets toxiques de MG et LMG, et des TAMs, qui ont contribué à la détermination des valeurs toxicologiques de référence à la base de la réglementation actuelle sur l'usage des triarylméthanés. Le **Tableau 4** récapitule les études clés, les effets associés et les NOAELs dérivant de ces études pour MG et LMG.

↳ La toxicité du MG et LMG

La DL50 la plus basse du MG a été fixée à 275 mg/kg sur la base d'une étude chez le rat Wistar après une exposition unique par gavage (Cleinmensen et al., 1984), ce qui conduit à une classification comme toxique en cas d'ingestion selon le règlement CLP 1272/2008 (Commission Européenne, 2008). Les principaux effets chez l'animal après une exposition aiguë sont une dilatation et une hyperhémie intestinale.

Aucune étude n'est disponible permettant de déterminer la DL50 du LMG.

↳ La toxicité à doses répétées

Les études disponibles sur la toxicité à doses-répétées du MG par voie orale indiquent que MG provoque une augmentation du poids du foie et des modifications des paramètres sanguins chez le rat et la souris après 28 jours d'exposition orale (Culp et al., 1999). Une NOAEL de 9,4 mg/kg p.c/j peut être fixée sur la base de modifications hématologiques observées chez les rats femelles à 94 mg/kg p.c/j (**Tableau 4**).

Le LMG induit également une augmentation du poids du foie et une modification des paramètres sanguins chez le rat mâle après une exposition de 28 jours dans la nourriture (Culp et al., 1999; Culp, 2004). Toutefois, aucune NOAEL du LMG ne peut être fixée sur la base de cette étude.

↳ La toxicité pour le développement et la reproduction

MG a montré induire une toxicité fœtale après une exposition par voie orale de lapines gestantes avec une diminution du nombre de fœtus vivants et une augmentation des anomalies squelettiques observées à toutes les doses, c'est pourquoi aucune NOAEL n'a pu être fixée (Meyer and Jorgenson, 1983).

LMG induit une toxicité maternelle et fœtale chez le rat Sprague-Dawley femelle après une exposition entre les jours 6 et 18 de gestation. Une augmentation des anomalies squelettiques chez les fœtus apparaît également. Une NOAEL de 10 mg/kg p.c/j a pu être fixée à partir de cette étude.

↳ La cancérogenèse

Le potentiel cancérogène du MG a été évaluée dans deux études chez l'animal (souris et rat). Aucun effet cancérogène du MG n'a été mis en évidence chez la souris B6C3F1 mâle ou femelle après une exposition via l'alimentation pendant 2 ans jusqu'à 63 mg/kg p.c/j (Culp, 2004; Culp et al., 2006).

Chez le rat, une faible augmentation de l'incidence d'adénomes folliculaires de la thyroïde et des carcinomes de la glande mammaire ont été observées. Même si ces effets ont été considérés comme faiblement pertinent pour classer MG comme composé cancérogène, le potentiel génotoxique *in vitro* et *in vivo* du MG a conduit l'EFSA à le proposer comme cancérogène (EFSA, 2016).

LMG a également montré des propriétés cancérogènes chez le rongeur, avec une augmentation des adénomes et des carcinomes hépatocellulaires chez la souris après une exposition au LMG via la nourriture pendant 2 ans (NTP, 2005; Culp et al., 2006). Suite à cette étude, il a été possible de définir une benchmark dose de 10 % (BMD10), c'est-à-dire la dose qui induit une augmentation de 10 % des tumeurs, de 13,1 mg/kg p.c/j.

Tableau 4 : Toxicité *in vivo* de MG et LMG. Source : (EFSA, 2016)

Toxicité aiguë					
MG					
Voie d'exposition	Espèces	DL50	Effets	Référence	
Voie orale- Gavage	Rat Sprague-Dawley Femelle	520 mg/kg p.c	Depression, prostration, coma, mort	(Meyer and Jorgenson, 1983)	
	Rat Wistar	275 mg/kg p.c	Hyperhémie et atonie intestinale, dilatation tractus intestinale. Absence de dismorphisme sexuelle	(Cleinmensen et al., 1984)	
LMG : Aucunes données disponibles					
Toxicité à doses répétées					
MG					
Nourriture, 0, 0,9, 9,4 and 94,5 mg/kg p.c/j	Espèces	Traitement	Effets	VTR	Référence
	Rats M et F Nourriture	28 jours	Hyperactivité, diminution du gain de poids et de la consommation de nourriture, ↑ lymphocytes ↓ neutrophiles ↑ urée plasmatique	9,4 mg/kg p.c/j (modifications hématologiques rats femelles)	(Culp et al., 1999)
LMG					
Nourriture, 0, 30, 60 and 115 mg/kg p.c/j	Rat mâle Fisher 344	28 jours	↓ Poids corporel ↓ Hématocrite, neutrophiles ↑ Poids du foie	LOAEL 30mg/kg p.c/j	(Culp et al., 1999; Culp, 2004)
Toxicité pour le développement et la reproduction					
MG					
Gavage, 0, 5, 10, 20 mg/kg p.c/j	Lapines gestantes New-Zealand	De J6 à J18 de gestation	↑ résorptions ↓ fœtus vivants ↑ Anomalies squelettiques	LOAEL 5 mg/kg p.c/j	(Meyer and Jorgenson, 1983)
LMG					
Gavage, 0, 10, 80, 160 mg/kg p.c/j	Femelles Sprague- Dawley	De J6 à J15 de gestation	↑ Perte implantation ↑ Anomalies squelettiques	10 mg/kg p.c/j	(Wan et al., 2011)
MG					
Nourriture, 0, 5, 15, 30 mg/kg p.c/j () 6, 17, 37 mg/kg p.c/j ()	Rat F344	2 ans	Légère augmentation des adénomes folliculaire de la thyroïde et des carcinomes de la glande mammaires	BMDL ₁₀ 13/mg p.c/j	(NTP, 2005)
LMG					
Nourriture, 0, 13, 31, 63 mg/kg p.c/j	Souris B6C3F1	2 ans	↑ adénomes et des carcinomes hépatocellulaires	/	(NTP, 2005; Culp et al., 2006)

↳ Génotoxicité du MG et du LMG

De nombreuses études *in vitro* et *in vivo* ont été réalisées pour déterminer la capacité génotoxique du MG. Alors que MG est considéré négatif *in vitro* lorsqu'il est soumis aux tests réglementaires, il a montré induire des cassures de l'ADN dans le test des comètes (Fessard et al., 1999). *In vivo*, MG a montré induire des micronoyaux dans la moelle osseuse chez la souris et à former des adduits à l'ADN dans le foie de rat et de souris (Culp et al., 1999).

L'ensemble de ces données a conduit l'EFSA à proposer MG comme mutagène *in vivo*.

Le profil génotoxique du LMG est assez similaire, avec une induction des mutations géniques observés *in vivo* chez la souris et la formation d'adduits à l'ADN au niveau du foie de souris. Ces effets ont conduit l'EFSA à considérer LMG comme mutagène *in vivo*.

↳ Effets toxiques chez les poissons

Chez la truite arc-en-ciel, des anomalies significatives du développement des œufs, principalement des ruptures chromosomiques, ont été signalées après une intoxication prolongée au MG. Un déclin marqué de la survie des embryons survient suite à une fertilisation de 38 h après une exposition prolongée à de fortes doses de MG; il existe des preuves d'un retard à l'éclosion et d'anomalies de la colonne vertébrale, de la tête, des nageoires et de la queue chez les alevins éclos de truite arc-en-ciel (Meyer and Jorgenson, 1983).

MG agit également comme un poison enzymatique respiratoire (Werth and Boiteux, 1968) et provoque une détresse respiratoire chez la truite arc-en-ciel (Ross et al., 1985). Une augmentation du taux de ventilation et du taux de respiration des truites ont été observés probablement attribués à un encrassement particulier des branchies, à la production de mucus et à des lésions épithéliales.

↳ Mécanisme d'action toxique de MG et LMG

En raison de sa structure en iminium, MG peut se comporter comme accepteur/donneur d'électrons conduisant à la formation d'espèces radicalaires oxygénées pouvant affecter certains processus cellulaires (par exemple la respiration mitochondriale). En effet, un cycle d'oxydoréduction *in vivo* avec l'oxygène peut survenir, donnant lieu à un stress oxydant par la génération d'espèces réactives de l'oxygène, telles que le peroxyde d'hydrogène, les hydroperoxydes, les peroxydes d'alkyle et divers radicaux (hydroxyle, alkoxyle, hydroperoxyde

et superoxyde) (Kovacic and Somanathan, 2014). En tant que colorant triarylméthane électrophile, MG peut former des adduits avec le GSH, les protéines et les nucléophiles liés aux protéines, pouvant éventuellement entraîner l'inhibition de l'activité enzymatique (Eldem and Özer, 2004; Tacal and Özer, 2004). De plus, MG et LMG peuvent être oxydés par le CYP450, produisant des amines primaires et secondaires; et aromatiques, ces métabolites peuvent subir une oxydation plus poussée, donnant ainsi lieu à des intermédiaires instables (-NHOH) et des dérivés nitroso- (-NO). Ces métabolites d'amines aromatiques secondaires et primaires pourraient se lier à l'ADN et former des adduits (Wang et al., 2012). Tous ces effets expliqueraient la capacité de MG et LMG à induire des tumeurs au niveau hépatique chez l'animal.

De plus, LMG a montré inhiber la thyroïde peroxydase *in vitro*, ce qui expliquerait les effets observés chez l'animal et les carcinomes folliculaires de la thyroïde (NTP, 2005).

⇒ Bilan de la toxicité de MG et LMG

L'ensemble de ces données montrent que le MG et le LMG ont un profil toxicologique très proche. La biotransformation du MG en LMG ne modifie pas sa toxicité.

Le MG et son métabolite majoritaire, LMG, sont des composés génotoxiques, cancérogènes et reprotoxiques chez l'animal.

Les effets potentiellement délétères du MG et du LMG pour la santé humaine et environnementale ont conduit les autorités à interdire son utilisation en aquaculture et à définir des niveaux de contaminations dans les aliments à ne pas dépasser.

↳ Une toxicité moins étudiée mais qui semble similaire chez les autres TAMs

De même que pour les études ADME, les données existantes de la littérature ainsi que les similarités entre structures nous laissent supposer des effets toxiques similaires pour les autres TAMs.

Le **Tableau 5** résume les données de toxicité des TAMs disponibles dans la littérature et les données issues des analyses QSAR pour les propriétés génotoxiques et cancérogènes. De manière générale, les TAMs présentent une toxicité aiguë par voie orale assez importante avec des DL100 ou 50 comprises entre 3 et 750 mg/kg en fonction des composés.

L'ensemble des TAMs ont été classés comme génotoxiques soit sur la base de données disponibles, pour le VBR en particulier, soit en faisant une comparaison de structure en utilisant les bases de données ouvertes de l'ECHA, celles du Danemark et les modèles QSARs disponibles (EFSA et al., 2017a). De même, l'ensemble des TAMs ne présente pas de structures chimiques à haut potentiel cancérigènes. Cependant leur propriétés génotoxiques en font des composés cancérigènes en-soi. Ces données ont permis à l'EFSA de définir des Toxicological Screening Value (TSV, valeurs de dépistage toxicologiques) fondées sur des considérations analytiques et toxicologiques, permettant de les classer (ci-après).

Tableau 5 : Données de toxicité disponibles sur les TAMs et leurs dérivés permettant le calcul des TSV respectives. Source : (EFSA et al., 2017a)

<i>Colorants</i>	Toxicité aiguë	Toxicité répétée	Génotoxicité	Cancérogénèse	Reprotoxicité	TSV (µg/kg p.c/j)
<i>Brilliant green (BG)</i>	DL 3mg/kg pc, iv, souris ⁽¹⁾	AD	+ *	-**	AD	0,0025
<i>Crystal violet (CV)</i>	DL50 96 mg/kg pc, v.o, souris ⁽²⁾	AD	+ *	-**	AD	0,0025
<i>Ethyl violet (EV)</i>	DL 320 mg/kg pc, vo, souris ⁽³⁾	AD	+ *	-**	AD	0,0025
<i>Pararosalinine</i>	ND	AD	+ *	- Rat, IP ⁽⁴⁾	AD	0,0025
<i>Victoria blue B (VBB)</i>	ND	AD	AD	AD	AD	-
<i>Victoria blue R (VBR)</i>	DL50 750 mg/kg, vo, souris ⁽⁵⁾	AD	+ in vivo ⁽⁶⁾	-**	AD	0,0025
<i>Victoria pure blue bo (VPBO)</i>	AD	AD	+ *	-**	AD	0,0025

* Données QSAR, ** n'appartient pas à une classe chimique à haut potentiel cancérigène, AD = absence de données, IV = intraveineuse, v.o = voie orale

(1) (Anderson et al., 1934)

(2) (Brock and Erhardt, 1951)

(3) (Schafer Jr and Bowles Jr, 1985)

(4) (Ketkar and Mohr, 1982)

(5) <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Victoria-Blue-R#section=Toxicity>

(6) (EFSA et al., 2017b)

↳ La récente classification des colorants par l'EFSA

Nous avons vu que les TAMs présentent un risque de toxicité comme MG, LMG, ainsi que la famille des Victoria blue par exemple, et peuvent s'accumuler dans les tissus de poisson. Aussi, l'EFSA a délivré ses opinions scientifiques dans un rapport d'évaluation sur la toxicité d'une liste de colorants. Il a été examiné l'intérêt d'établir une limite réglementaire appelée RPA (Reference Point for Action) pour ces substances actives pharmacologiques non autorisées. La notion de RPA sera détaillée dans le chapitre 2.1. Dans ce rapport (EFSA et al., 2017a), 22 colorants de différentes classes font l'objet de cette évaluation toxicologique afin de fixer une TSV selon un arbre décisionnel (**Figure 16**).

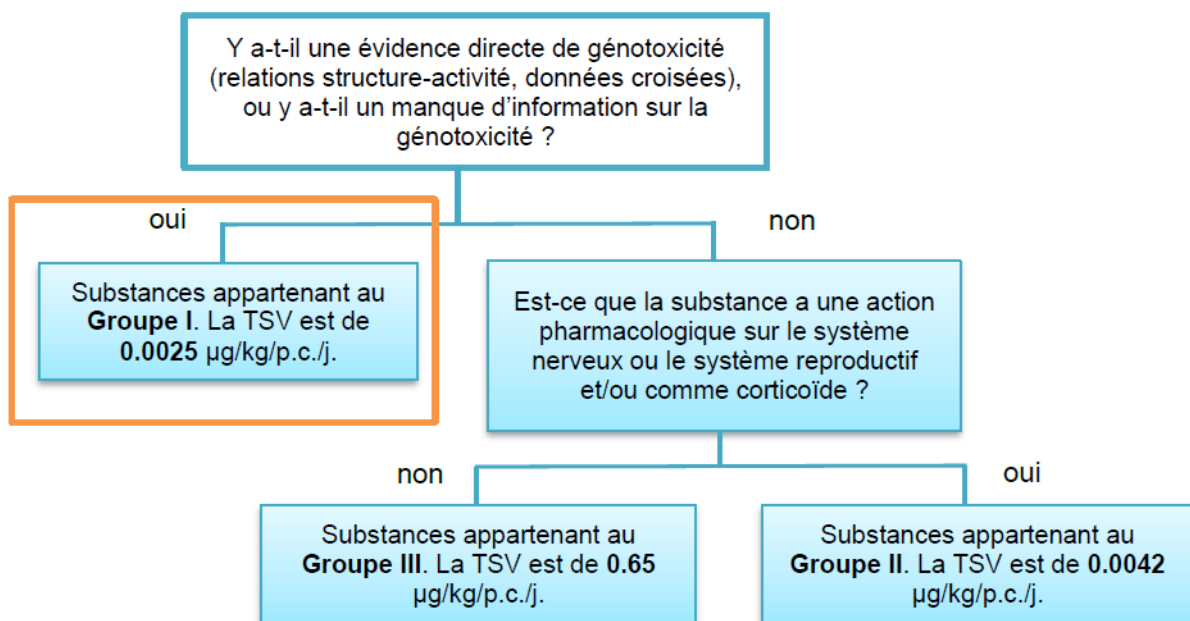


Figure 16 : Arbre décisionnel pour assigner des TSV pour les substances non autorisées à activité pharmacologique . Source : (EFSA, 2013b; EFSA et al., 2017a)

Parmi cette liste, 12 colorants ou métabolites ont été plus particulièrement étudiés au cours de cette thèse en étant intégré à une démarche de développement analytique. Il s'agit de : VPBO, BG, LBG, VBB, CV, LCV, EV, MB, VBR, NBA, PRRA, RHG. Pour chaque substance, plusieurs questions relatives à la toxicité ont été examinées par l'EFSA:

Tableau 6 : Questions évaluées afin d'établir une TSV pour une liste de colorants. Source : (EFSA et al., 2017b)

Q1 : La substance a-t-elle un haut pouvoir carcinogène ?

Q2 : La substance provoque-t-elle de l'allergie ?

Q3 : La substance provoque-t-elle de la dyscrasie* ?

Q4 : Y a-t-il une évidence directe de génotoxicité, ou un manque de preuve concernant la génotoxicité ?

Q5 : La substance agit intentionnellement sur le système nerveux ou le système reproductif et ou/ est-ce un corticoïde ?

*Trouble de la coagulation sanguine

Les réponses associées de l'EFSA ont été formulées en s'appuyant sur les données existantes dans la littérature. Sur les 12 colorants ou métabolites listés ci-dessus, les questions Q1, Q2, Q3, Q5 ont reçues une réponse par la négative (**Tableau 6**). Seule une réponse positive a été apportée à la question Q4, et cela pour tous les colorants, en raison d'un manque d'information et de données scientifiques sur la génotoxicité de ces composés. Selon l'arbre décisionnel, une **TSV de 0,0025 µg/kg pc par jour** a été fixée pour cette dernière raison. Cette TSV est dérivée du concept pragmatique de seuil de considération toxicologique ou Threshold of Toxicological Concern (TTC) développé par Munro (Munro et al., 2008). Il est considéré que pour les composés génotoxiques susceptibles d'être retrouvés dans l'alimentation, une exposition de 0,0025 µg/kg pc/j n'entraîne pas un risque supplémentaire de cancérogenèse.