

**Résumés**  
**des conférences**  
**du colloque**  
**« Analyse de traces et ultra-traces :**  
**Enjeux et perspectives »**  
**du 4 juin 2009**  
**au CNAM**

## **Evolutions techniques de l'ICP-MS depuis 20 ans et nouvelles applications**

**Philippe TELOUK**

E mail : [philippe.telouk@ens-lyon.fr](mailto:philippe.telouk@ens-lyon.fr)

*Ecole Normale Supérieure de LYON, 46 allée d'Italie, 69364 LYON cedex 07*

Les enjeux de l'analyse de traces et ultra-traces sont divers touchant des domaines de société, industriels ou même normatifs. Les analyses de ce type sont devenues indispensables pour avoir des informations sur l'impacts des polluants à court et long terme, sur le contrôle des produits alimentaires ou la maîtrise de divers processus industriels. Le développement de technique d'analyse de traces et ultra-traces comme ce que l'ICP-MS a connu ces vingt dernières années a permis d'ouvrir de nouvelles possibilités d'analyses.

Nous verrons donc comment les choses ont évoluées pour passer d'un ICP-MS a torche verticale en 1979 à des ICP-MS à multi-collection et Haute Résolution en 2009. Le problème maintenant n'est plus tellement technique car les sensibilités sont devenues très importantes mais plus un problème de préparation des échantillons les plus propres possible et le fait de bien maîtriser les blancs tout au long du processus d'analyse.

Les dernières avancées techniques ont maintenant ouvert la voie à de nouvelles applications dans des domaines très variés et nous verrons certains de ceux-ci comme la géologie, la biologie ou l'archéologie.

## Analyse de Substances pharmaceutiques dans l'environnement aquatique

Hélène Budzinski  
Université Bordeaux I  
ISM-LPTC – UMR 5255 CNRS  
351 crs de la Libération, 33405 Talence  
E mail : [h.budzinski@ism.u-bordeaux1.fr](mailto:h.budzinski@ism.u-bordeaux1.fr)

Les substances pharmaceutiques sont des composés synthétiques d'usage très répandu, créés pour avoir un effet biologique thérapeutique. A côté des principaux contaminants chimiques de l'environnement (HAP, PCB, pesticides, phtalates, métaux lourds, alkylphénols, dioxines...) on trouve des substances telles que des stéroïdes synthétiques (œstradiol, testostérone) utilisés dans de nombreux traitements hormonaux. On trouve également divers médicaments de type anti-dépresseur (diazepam, amitriptyline), analgésique (ibuprofène, acétaminophène, acide acétyl-salicylique), antibiotique (néomycine, chloramphénicol, tétracyclines), hypolipémiant (acide clorifibrique, gemfibrozil). Ces différentes molécules actives sont consommées en quantités très importantes dans notre société occidentale et rejetées *in fine* dans le milieu aquatique via les stations d'épuration (STEP) (destruction incomplète), les élevages d'animaux ou encore le lessivage des décharges. Ces composés sont étudiés depuis peu de temps de façon approfondie et motivent actuellement de nombreuses études. En effet ils peuvent présenter un risque environnemental non négligeable si l'on considère d'une part les quantités potentiellement apportées au milieu aquatique et d'autre part le fait qu'elles aient été fabriquées pour être biologiquement actives. Cet exposé présentera l'état de la connaissance actuelle concernant ces composés quant à leur statut de nouveaux contaminants des systèmes aquatiques. Les différentes études menées ces dernières années ont prouvé leur présence dans de nombreux écosystèmes aquatiques dans des gammes de concentrations allant des ng/L aux µg/L. Les STEP se sont révélées être les points d'entrée majeurs de cette contamination vers le milieu aquatique sans pouvoir pour autant négliger les différents types d'élevage notamment intensifs. On manque encore néanmoins de données quant à leur impact toxique et à leur devenir environnemental pour pouvoir conclure de façon satisfaisante sur ce type de pollution.

Bien que la présence de ces composés soit maintenant avérée dans les différents compartiments de l'environnement aquatique nous sommes confrontés à des teneurs relativement faibles comprises entre le ng/L et les µg/L. Ce qui nécessite pour étudier correctement ce type de contamination de développer des méthodes d'analyse dites ultra-traces (ppt) et de type « multi-résidus » puisque la pollution liée aux substances pharmaceutiques est de fait multi-composés (de propriétés et de réactivité très différentes). Dans certains cas il est nécessaire d'étudier ces composés dans des concentrations inférieures au ng/L (cas des hormones par ex.) car c'est à ces teneurs là que s'expriment les effets toxiques. Différents exemples seront présentés avec les problèmes associés (identification, confirmation des composés ; problèmes de blancs ; incertitude ; ...).

Cet exposé présentera enfin les résultats d'une étude qui après avoir mis au point les différents protocoles d'analyse de ces composés (phase dissoute, phase particulaire, organismes), a permis de dresser un premier bilan de la contamination de différents systèmes aquatiques (Seine, Gironde, Hérault, milieu marin côtier atlantique et méditerranéen). Ce projet a fait appel à différentes techniques analytiques dans le domaine de l'analyse physico-chimique organique environnementale (LC/MS, GC/MS, extraction assistée par micro-ondes, SPE...). Différentes campagnes de prélèvement ont été menées dans les différents systèmes étudiés. Ces travaux ont permis de mettre en évidence une réelle contamination du milieu aquatique quelque que soit le système étudié par ces composés. En effet la majorité des composés recherchés ont été retrouvés dans l'ensemble des prélèvements. Les concentrations mesurées vont, selon les composés, les stations et les saisons de quelques dizaines de ng/l à quelques centaines de ng/l pour les eaux de rivière ou les eaux marines. Dans le cas des rejets de STEP, les concentrations mesurées sont fortes (de quelques centaines de ng/l à quelques milliers de ng/l variant selon la localisation, la saison et la nature du composé) démontrant leur implication dans la contamination des milieux aquatiques par les substances pharmaceutiques. Ces travaux se sont non seulement intéressés à la contamination de la phase dissoute mais également à celle de la phase particulaire démontrant clairement que le compartiment dissous est le plus contaminé mais également que les phases particulaire et sédimentaire pourraient également jouer un rôle non négligeable dans la distribution de ces composés dans l'environnement aquatique.

## **Extraction sélective de molécules à l'état de traces d'échantillons complexes : apport des anticorps, des aptamères et des polymères à empreintes moléculaires**

Valérie Pichon, Benjamin Madru, Annabelle Cingöz, Florence Chapuis-Hugon

Laboratoire Environnement et Chimie Analytique (UMR PECSA 7195 CNRS-ESPCI-UPMC), ESPCI ParisTech, 10 rue Vauquelin, 75231 Paris cedex 05- [valerie.pichon@espci.fr](mailto:valerie.pichon@espci.fr)

Quel que soit le domaine d'application (clinique, agroalimentaire, environnemental,...), le challenge analytique est souvent lié aux faibles teneurs recherchées mais aussi à la diversité des composés. Malgré l'évolution de l'instrumentation notamment dans les domaines des séparations rapides et de la détection par spectrométrie de masse, ces faibles niveaux de concentration requièrent d'introduire des étapes de préconcentration avant analyse. De plus, la complexité de la majorité des échantillons à analyser impose l'introduction de méthodes permettant d'apporter un degré de purification important au cours de cette étape de traitement contribuant ainsi à une augmentation des performances de la méthode globale d'analyse. Parmi les approches possibles, des supports d'extraction, mettant en jeu un mécanisme de rétention plus sélectif que celui mis en jeu sur les supports d'extraction conventionnels car fondés sur un principe de reconnaissance moléculaire, peuvent être développés. L'objectif est alors d'extraire sélectivement une molécule ou une famille structurale de molécules en l'isolant des autres constituants de l'échantillon de manière à rendre leur analyse quantitative plus fiable et plus sensible.

Pour ce faire, il est possible d'utiliser des supports d'immunoaffinité (ou immunoadsorbants) basés sur l'utilisation d'anticorps spécifiques des molécules d'intérêt. La grande sélectivité et la grande affinité de l'interaction antigène-anticorps permet alors l'obtention d'un extrait propre et de facteurs d'enrichissement élevés. Ce mécanisme de rétention basé sur la reconnaissance moléculaire peut aussi être obtenu lors de l'utilisation de polymères à empreintes moléculaires dont la voie de synthèse permet l'obtention de cavités mimant un site de reconnaissance antigène-anticorps. Enfin, des supports greffés par des aptamères à savoir par une séquence de nucléotides permettant une reconnaissance structurale de forte affinité analogue à celle de l'interaction antigène-anticorps peuvent aussi être mis en œuvre à des fins d'extraction. Cette présentation a pour objectif la comparaison de ces différentes approches en exposant les principes, les avantages et les limites de ces outils d'extraction sélective. A cet effet, de nombreuses applications seront présentées.

Leur intégration dans des systèmes séparatifs miniaturisés dont l'objectif est de répondre aux besoins analytiques actuels (rapidité, peu de consommation de solvant et autres réactifs, mesures in situ ou in vivo, faible quantité d'échantillons) sera également discutée.

## Génotypage plaquettaire : vers l'analyse par biocodes barres et biocapteur à ondes évanescentes.

Marie Trévisan<sup>a</sup>, Eliane Souteyrand<sup>a</sup>, **Jean-Pierre Cloarec**<sup>a</sup> & Yves Mérieux<sup>b</sup>

a Institut des nanotechnologies de Lyon, UMR 5270 CNRS, Ecole Centrale de Lyon.

b Etablissement français du sang Rhône-Alpes

e mail : [jcloarec@ec-lyon.fr](mailto:jcloarec@ec-lyon.fr)

Parmi les différents types de groupage sanguin, le groupage plaquettaire n'est pas réalisable par des méthodes sérologiques comme ceci est pratiqué pour le groupage des globules rouges.

A l'heure actuelle, le groupage plaquettaire est réalisé par biologie moléculaire, nécessitant une extraction de l'ADN et une amplification par PCR. La transfusion plaquettaire peut dans certain cas clinique (thrombopénie néonatale allo immune) présenter un caractère d'urgence. Il est donc nécessaire de développer d'autres techniques et surtout des méthodes de lecture plus rapide que celle utilisée actuellement.

Notre objectif est de développer un test de typage plaquettaire au moins aussi fiable et sensible que la PCR, tout en étant plus rapide, et compatible avec une analyse à haut débit (300 000 mesures / an à l'EFS R-A).

Nous explorons une approche fondée sur l'emploi des biocodes barres, stratégie proposée par le groupe de Chad Mirkin, combinée avec un prototype de biocapteur de fluorescence à ondes évanescentes. La stratégie « biocodes barres » décrite dans la littérature a permis de procéder à des analyses de biomolécules avec des seuils inférieurs de détection de l'ordre de 30 attomolaire ( $30 \cdot 10^{-18}$  mol/l), potentiellement compatible avec une analyse sans amplification PCR. Les biocapteurs à onde évanescente permettent d'analyser en quelques minutes des biomolécules, avec une excellente sensibilité.

Nos premiers travaux ont permis de détecter et distinguer, en moins de 3 heures, des oligonucléotides ne différant que d'un nucléotide. Ceci nous a permis de valider notre procédé de fabrication de biocodes barres, de tester les mesures sur notre biocapteur et d'améliorer le rapport signal/bruit. La suite des travaux portera sur l'évaluation du seuil inférieur de détection de notre méthode, et l'analyse de véritables sérums humains.

## **Du profilage du génome au développement de diagnostics sanguins**

Diego PALLARES

Associate Director Bioinformatics

ExonHit Therapeutics SA, 65 boulevard Masséna, Paris

E mail : [diego.pallares@exonhit.com](mailto:diego.pallares@exonhit.com)

Alternative RNA splicing is an essential, naturally occurring biological process in which a single gene directs the production of several proteins. However, abnormal alternative RNA splicing events can lead to the production of proteins that may trigger or contribute to the onset of various diseases. ExonHit has developed tools (SpliceArray™ products) to specifically monitor multiple transcripts of the same gene. These tools don't just look at whole genes, like most gene profiling techniques do, they actually consider smaller elements that are the exons and the junctions between those. ExonHit is applying these tools to the identification of disease signatures in order to develop new blood-based diagnostics. The presentation will focus on showing how we can analyze these events at the RNA level and how, from over 2 million probes, we can identify a disease signature based on less than 200 of these.

## Utilisation de la Métabonomique dans l'évaluation du risque d'une substance chimique

J.-M. Colet

E mail : [Jean-Marie.Colet@umh.ac.be](mailto:Jean-Marie.Colet@umh.ac.be)

Université de Mons, Département de Biologie Humaine et de Toxicologie, Mons, Belgique.

La **METABONOMIQUE** est une technologie émergente qui complète idéalement l'image partielle des processus biologiques obtenue jusqu'ici par les approches de la génomique et de la protéomique. Elle a été définie par Jérémy Nicholson comme « *la mesure quantitative de la réponse métabolique multi-paramétrique et temporelle de systèmes vivants à des stimuli patho-physiologiques ou une modification génétique* ». L'application de la métabonomique implique la création de bases de données multivariées à partir d'animaux contrôles, d'animaux malades ou utilisés dans le développement pharmaceutique, de volontaires sains, ou encore de patients. Elle permet l'acquisition simultanée de paramètres biochimiques multiples à partir d'échantillons biologiques.

La métabonomique est le plus souvent réalisée à partir de biofluides (urine, sérum, fluide cérébro-spinal, bile, ou salive), mais il est également possible d'utiliser des cultures cellulaires ou des extraits de tissus. La métabonomique tire profit des perturbations de concentrations et de flux des métabolites endogènes impliqués dans les voies biochimiques cellulaires pour déceler des altérations précoces provoquées par une maladie, une toxine, ou encore l'exposition à une substance chimique. En effet, la réponse des cellules à ces éléments de stress conduit généralement à un ajustement de l'environnement extra-cellulaire pour maintenir l'homéostasie. Cet ajustement métabolique se manifeste sous la forme d'une empreinte métabolique caractéristique de la nature et/ou du site du processus toxique ou de la maladie.

Une variété de méthodes analytiques peuvent être utilisées pour générer les profils métabonomiques, fournissant des jeux de données riches en information moléculaire. La plupart des recherches utilisent la spectrométrie de masse et la résonance magnétique nucléaire du proton ( $^1\text{H-RMN}$ ), qui s'est révélée comme la technologie la plus puissante pour l'analyse des biofluides et pratiquement la seule capable d'étudier des tissus intacts. La  $^1\text{H-RMN}$  établit un profil métabolique sans recours à une pré-sélection des paramètres de mesure ou à une procédure de séparation.

Finalement, afin d'isoler les changements pertinents et significatifs parmi toute la variabilité observée dans les jeux de données spectrales collectés à partir d'une cohorte d'animaux ou de personnes, l'utilisation d'analyses de données multivariées est indispensable.

## La spéciation des métaux en milieux biologiques: vers la métallomique

Ryszard Lobinski

E mail : [Ryszard.Lobinski@univ-pau.fr](mailto:Ryszard.Lobinski@univ-pau.fr)

Laboratoire de Chimie Analytique Bio-inorganique et Environnement, UMR 5254, CNRS,  
Hélioparc, 2, av. Pr. Angot, 64053 Pau

Les performances des méthodes d'analyse des éléments traces et ultratracés dans des systèmes biologiques analytiques se sont considérablement améliorées lors des dix dernières années grâce à la maîtrise de la contamination et la démocratisation de la spectrométrie de masse plasma à couplage inductif (ICP MS). Cependant, le statut élémentaire seul d'un organisme vivant (plante, animal ou être humain), même déterminé très précisément, s'avère d'être insuffisant pour la compréhension des mécanismes de biodisponibilité, d'assimilation, de toxicité et d'excrétion des éléments à l'état des traces. Le message clé à la compréhension de la fonction spécifique d'un élément dans la nature est véhiculé par sa forme chimique: le degré d'oxydation, un environnement de coordination, une entité organométallique ou un complexe avec un bioligand, d'où l'intérêt dans la spéciation d'un élément.

Largement influencée par la révolution génomique, la philosophie des recherches sur la spéciation des éléments en milieux biologiques est en train d'évoluer rapidement. Le domaine de recherche émergent, la métallomique, vise les cibles protéiques des métaux (ex. protéines réceptrices, chélatantes, transporteurs) et l'étude des métalloprotéines *in vivo* à des fins de rationalisation des processus cellulaires mis en jeu, de modélisation de scénarios d'exposition chronique ou d'intoxication aiguë, pour, à terme, élaborer des stratégies de prévention et de traitement. L'acquisition de l'information sur la distribution de métaux et de ces formes chimiques à l'échelle de cellules, de tissus ou d'organismes entiers devient l'un des objectifs phare des disciplines scientifiques très variées telles que la toxicologie environnementale, biorémediation, nutrition des plantes et biotechnologie alimentaire, la pharmacologie et la chimie clinique. Au cœur de ces problématiques se trouvent évidemment les techniques analytiques performantes qui permettent de mesurer la présence de formes chimiques d'éléments à l'état d'ultra traces, de les quantifier et de suivre leur devenir et leur évolution dans les cellules vivantes et les systèmes cellulaires.

La conférence donne un aperçu des avancées récentes dans la méthodologie analytique pour la détection, l'identification et la quantification des formes chimiques des métaux à l'état de traces en milieu biologique. Les derniers développements des interfaces entre les techniques séparatives de haute résolution, utilisées en protéomique et métabolomique, et la spectrométrie de masse à plasma induit (ICP MS) rendent celle-ci la technique pivot de la détection ultrasensible, spécifique et quantitative *in vivo* des biomolécules contenant dans leur structure un métal ou un métalloïde.

1. R. Lobinski, *Actualité Chimique*, 2007, **306**, 14-182.
2. S.Mounicou, J. Szpunar, R. Lobinski, *Chem. Soc. Rev.*, 2009, **38**, 1119–1138



## **Les analyses de trace en Exobiologie**

*F. Raulin*

*LISA, UMR CNRS 7583, Univ. Paris 7 & 12, Créteil, France.*

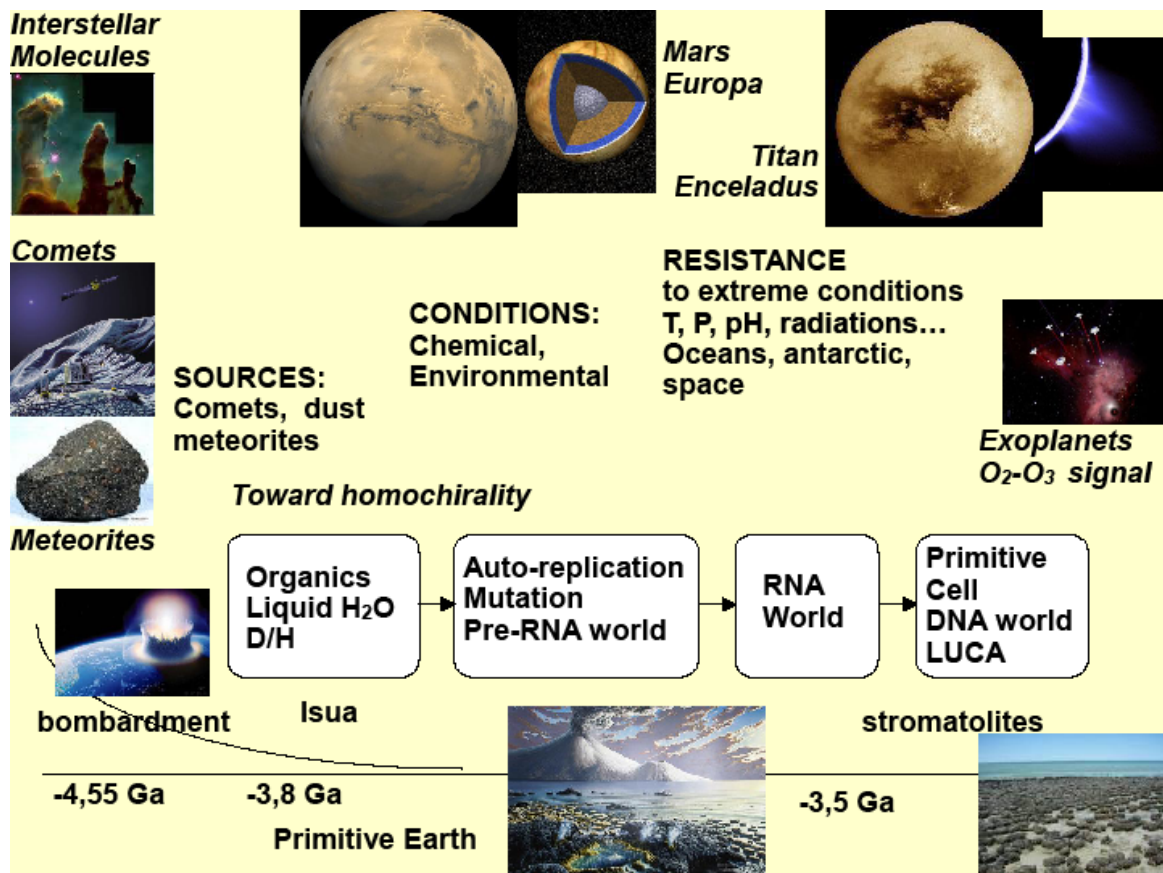
*E-mail: [francois.raulin@lisa.univ-paris12.fr](mailto:francois.raulin@lisa.univ-paris12.fr)*

L'exobiologie est l'étude de la vie dans l'univers: étude des origines, de la distribution et de l'évolution de la vie ainsi que des structures et processus qui y sont liés. Les principales approches sont très variées (Fig 1) : de l'étude de la chimie prébiotique en laboratoire pour comprendre les processus qui ont conduit à l'origine de la vie sur Terre, à l'exploration spatiale pour rechercher des traces de vie extraterrestre. Elles utilisent trois principales approches : les expériences en laboratoire, la modélisation théorique et l'observation, à distance ou *in situ*. Dans ce dernier cas, les techniques d'analyse de trace sont un élément clé pour la recherche de traces de vie présente ou passée ou la recherche de molécules organiques dans des environnements extraterrestres. Mais elles sont aussi cruciales pour analyser les produits obtenus lors d'expériences en laboratoire simulant l'évolution d'un environnement planétaire d'intérêt exobiologique et pour l'analyse sur Terre d'échantillons extraterrestres (météorites, micro-météorites, comètes, et, à moyen terme, échantillons Martiens rapportés sur Terre lors d'une future mission de retour d'échantillon de la planète rouge).

De nombreuses techniques d'analyse (moléculaires, isotopiques et chirales) ont déjà été mises au point pour l'analyse *in situ* d'environnement extraterrestres à partir de sondes robotisées. Dans ce domaine ; les techniques de chromatographie en phase gazeuse couplées à la spectrométrie de masse ont connu un très fort développement pour application aux missions spatiales. Des systèmes de CPG-SM miniaturisés à multi-colonnes chromatographiques, utilisant des nanoTCD, et couplés à la pyrolyse, à la dérivatisation chimique et à la thermochemolyse, ont déjà été utilisés ou sont en cours de développement pour les futures missions d'exploration de la planète Mars. L'analyse exobiologique de la surface d'Europe, un des satellites de Jupiter et de Titan, le plus grand satellite de Saturne, prévue dans les missions à long terme de ces objets, nécessitera des outils performants et très sensibles d'analyse moléculaire, isotopique et chirale, compatibles avec les contraintes d'une mission spatiale.

Les systèmes actuels seront présentés dans leur contexte, ainsi que l'évolution attendue de ces techniques pour l'exploration planétaire dans un futur à moyen et long terme.

Fig. 1 – Vue schématique des nombreuses approches de l'exobiologie



## References

- [1] M. Gargaud, B. Barbier, H. Martin & J. Reisse Eds, Lectures in Astrobiology, Vol. 1 Springer (2005)
- [2] M. Gargaud, P. Claeys, P. Lopez-Garcia, H. Martin, T. Montmerle, R. Pascal & J. Reisse Eds, From Suns to Life, A chronological approach to the history of Life on Earth, Springer (2006)

Nathalie MECHIN

**Dopage : Traces de produits illicites et interprétations  
des résultats d'analyses antidopage en milieu sportif**

E mail : [analyses@aofd.fr](mailto:analyses@aofd.fr)

Dans le domaine du contrôle antidopage en milieu sportif, les traces de produits illicites ou de leurs métabolites dans les milieux biologiques en particulier l'urine, s'apprécient en comparant la concentration des analytes au niveau minimal de performance exigé pour les laboratoires antidopage.

La gestion des traces relance le débat entre ceux qui défendent un système de lutte antidopage restrictif, avec focalisation sur les situations caricaturales (logique de non proportionnalité), et ceux qui défendent un système de lutte antidopage non restrictif et plus adapté à la complexité du dopage (logique de proportionnalité).

Dans l'immédiat, les autorités en charge de la lutte antidopage ont répondu à cette problématique en recommandant de ne pas rapporter certains résultats analytiques qui peuvent relever d'une exposition passive, à l'instar de ce qui était pratiqué pour les expositions au cannabis. Cette mesure n'est toutefois applicable qu'à des produits illicites mineurs comme les stimulants mais n'est pas applicable à des produits illicites majeurs comme les anabolisants pour lesquels l'exposition est d'emblée considérée comme active.

Les sources d'exposition passives sont difficilement identifiables voire imprévisibles.

## **Analyse de traces de nature biologique dans un contexte criminalistique**

Luc Rexach, INPS, LPS Paris - Division Biologie (75001) [luc.rexach@interieur.gouv.fr](mailto:luc.rexach@interieur.gouv.fr)

L'Institut National de Police Scientifique (INPS) a été créé en 2006. Il est composé, outre d'un Service Central des Laboratoires basé à Ecully (69), de 5 Laboratoires de Polices Scientifiques (LPS) répartis sur l'ensemble du territoire national (Lille, Lyon, Marseille, Paris, Toulouse) ainsi que du Laboratoire de Toxicologie de la Préfecture de Police (Paris 12<sup>ème</sup>). L'INPS peut être requis par des officiers de police judiciaire (OPJ), par des magistrats du Parquet (Procureurs et Substituts) ou commis par des juges d'instruction dans le cadre d'expertise à réaliser dans le domaine pénal.

Le LPS Paris est composé d'une Division Administrative et de 3 Divisions Scientifiques : la Division Balistique [analyse des armes, des projectiles, des trajectoires de tir, recherche d'antériorité d'utilisation des armes et des munitions, ...], la Division Matériaux & Traces [analyse de documents falsifiés, de faux billets, comparaison d'encre, d'écritures, recherche de résidus de tir, analyse de peinture, de verre, ...] et la Division Biologie [détermination du profil génétique de traces de nature biologique et comparaison avec le profil génétique d'individus (victimes, mis en cause, familiers, intervenants sur scène de crime)].

Pour ce qui concerne la biologie, seront évoquées la stratégie d'analyse des traces et les techniques mises en œuvre pour répondre à nos missions :

- test d'orientation pour déterminer la nature des traces [recherche de l'activité peroxydasique du sang, recherche de la phosphatase acide du sperme, recherche de l'activité amylasique de la salive, ...] et, le cas échéant, prélèvements de traces dites de contact.
- analyses génétiques : extraction d'ADN par différentes méthodes (matrice « Chelex », colonnes d'adsorption, billes magnétiques, ...), quantification d'ADN (PCR en temps réel), amplification d'ADN (PCR multiplex), révélation de produits amplifiés (électrophorèse capillaire).

Les avantages, les sensibilités et les limites de ces différentes techniques, dans ce domaine d'activité spécifique, seront discutées.

Pour conclure, sera abordé l'intérêt ou non de tendre aux limites de détection de ces techniques, voire de chercher à utiliser des techniques de plus en plus sensibles, ceci en corrélation avec l'exploitation des résultats, leur interprétation (calcul de risque de coïncidence fortuite) et leur pertinence par rapport à l'aide à l'enquête qui reste l'objectif premier.

# SECURITE CHIMIQUE DE L'ALIMENT : LA TRAQUE A LA TRACE

Bruno LE BIZEC,

Gaud PINEL, Emmanuelle BICHON, Fabrice MONTEAU, Jean-Philippe ANTIGNAC

Laboratoire d'Etude des Résidus et Contaminants dans les Aliments (LABERCA),  
Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes (ENVN), BP 50707, F-44307 Nantes Cedex 3, France  
[laberca@vet-nantes.fr](mailto:laberca@vet-nantes.fr), [www.laberca.org](http://www.laberca.org), [www.saraf-educ.org](http://www.saraf-educ.org)

La sécurité chimique des aliments repose aujourd'hui – entre autres – sur un dispositif réglementaire qui s'articule autour de plusieurs directives, décisions, ou règlements de première importance. La directive 96/23/EC pose les fondamentaux de l'organisation du contrôle notamment en terme d'échantillonnage (espèces d'animaux de production, matrices, nombre d'échantillons, fréquences de prélèvement...) et de substances devant être contrôlées. La directive 96/22/EC rappelle l'interdiction d'usage des promoteurs de croissance à destination des animaux de production. Le règlement 2377/90/EC renvoie aux limites maximales de résidus devant être respectées dans les denrées alimentaires destinées à l'homme vis-à-vis des résidus de médicaments vétérinaires. Enfin, les critères analytiques devant être respectés en terme de validation des méthodes, de performance de méthodes ou encore d'interprétation des signaux spectrométriques, sont donnés dans la décision « analytique » 2002/657/EC.

Les progrès de la technologie vécus dans ce domaine ces vingt dernières années ont permis d'améliorer spectaculairement les performances des méthodes analytiques appliquées par les laboratoires officielles. La spectrométrie de masse introduite dès 1990 était d'abord couplée à la chromatographie en phase gazeuse pratiquement jamais à la chromatographie liquide. Les analyseurs de masse ont d'abord été de type simple quadripolaire ou encore piège à ions tridimensionnel. Un exemple est donné dans la présentation sur les  $\beta$ -agonistes ; les chromatogrammes d'ions projetés montrent clairement que des traces résiduelles dans l'urine à hauteur de  $1 \text{ ng.mL}^{-1}$  étaient détectables à cette époque. L'identification non ambiguë n'était toutefois pas aisée à ce niveau de concentration. C'est pourquoi des réactions de dérivation ont été développées afin de générer d'avantage d'ions diagnostiques, plus lourds ( $m/z \uparrow$ ), qui permettent alors sur les mêmes instruments (GC-MS quadripolaire, EI, SIM) de rendre incontestable l'identification des molécules ciblées. L'introduction de la MS/MS en 1995 va encore accélérer la diminution du bruit (meilleure spécificité des transitions SRM), et par ricoché l'amélioration du rapport signal sur bruit, donc *in fine* la sensibilité. Parallèlement, certaines équipes ont introduits la haute résolution ( $R > 10,000$ ) sur double secteur ; la détection de traces aussi faibles que la dizaine de ppt ( $\text{ng.kg}^{-1}$ ) ont alors été rendus possibles (exemples donnés pour les thyrostatiques et les  $\beta$ -agonistes). Le couplage LC-MS (ionisation électrospray) a réellement pris son essor à la fin des années 90, avec des applications convaincantes pour les analytes parmi les plus polaires et les plus thermolabiles ; cette approche est aujourd'hui assez généralement utilisée dans le domaine surtout sur triple quadripôles, mais également sur piège à ions, ou système hybride de type Q-trap. Assez récemment, une tendance à l'utilisation de système LC-TOF est à souligner dans l'optique de surveiller par approche ouverte (non ciblée) un grand nombre de résidus de médicaments vétérinaires par exemple. Pour des exercices nécessitant encore davantage de sensibilité, des stratégies utilisant la génération d'ions négatifs après dérivation spécifique de l'analyte cible et leur détection par MS/MS, a permis de détecter des quantités aussi basses que la centaine de fg pour les stéroïdes, ce qui n'avait jamais été atteint jusqu'alors. Des limites basses de détection ne sont pas toujours suffisantes, et il faut parfois avoir recours pour ces traces à une

connaissance fine de leur composition isotopique ceci pour certains éléments comme le carbone ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) ou l'hydrogène ( $^2\text{H}/^1\text{H}$ ). C'est pourquoi la GC/C/IRMS a été exploitée à la fin des années 90 dans notre domaine. Cette approche rend aujourd'hui possible la démonstration de l'administration de stéroïdes gonadiques (testostérone, estradiol...) dans l'urine d'animaux de production, donc la fraude associée. Lorsque la trace des résidus n'est plus (ou pas) visibles (conséquence de l'utilisation de molécules inconnues par les fraudeurs, ou de cocktails de substances à basses concentrations), une approche moins ciblée visant la démonstration de l'effet biologique associé à l'administration par la mise en évidence de la présence de biomarqueurs (empruntés au métabolome) semble pertinente et prometteuse. Cette approche – la métabolomique – s'appuie sur la prise d'empreinte de l'échantillon biologique grâce à un couplage LC-MS avec acquisition du signal en haute (TOF) ou très haute résolution sur analyseur FT-MS (ICR ou Orbitrap).

#### Quelques références récentes :

- Bailly-Chouriberry L, Pinel G, Garcia P, Popot M.-A, Bonnaire Y, Le Bizec B. Identification of recombinant equine growth hormone in equine plasma by LC-MS/MS measurements as a confirmatory method for doping control. *Analytical Chemistry* 2008;80:8340-8347.
- Bichon E, Kieken F, Cesbron N, Monteau F, Prévost S, André F and Le Bizec B. Development and application of stable carbon isotope analysis to the detection of cortisol administration in cattle. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2007;21:2613-2620.
- Courant F, Antignac J-P, Maume D, Monteau F, Andersson AM, Skakkebaek N, André F, Le Bizec B. Exposure assessment of prepubertal children to steroid endocrine disrupters. Analytical strategy for estrogens measurements in plasma at ultra-trace level. *Analytica Chimica Acta* 2007;586:105-114.
- De Brabander H, Le Bizec B, Pinel G, Antignac JP, Verheyden K, Mortier V, Courtheyn D and Noppe H. Review. Past, present and future of mass spectrometry in the analysis of residues of banned substances in meat-producing animals. *Journal of Mass Spectrometry* 2007;42(8):983-998.
- Le Bizec B, Courant F, Gaudin I, Bichon E, Destrez B, Schilt R, Draisci R, Monteau F, André F. Criteria to distinguish between natural situations and illegal use of boldenone, boldenone esters and boldione in cattle. 1 - Metabolite profiles of boldenone, boldenone esters and boldione in cattle urine. *Steroids* 2006;71(13-14):1078-1087.
- Le Bizec B, Van Hoof N, Courtheyn D, Gaudin I, Van De Wiele M, Bichon E, De Brabander H and André F. New anabolic steroid illegally used in cattle – structure elucidation of 19-norchlorotestosterone acetate metabolites in bovine urine. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2006;98(1):78-89.
- Le Breton MH, Rochereau-Roulet S, Pinel G, Bailly-Chouriberry L, Rychen G, Jurjanz S, Goldmann T and Le Bizec B. Direct determination of recombinant bovine somatotropin in plasma from a treated goat. *Rapid Communication in Mass Spectrometry* 2008;22:3130-3136.
- Mooney M, Le Bizec B and Elliott C. Combining biomarker screening and advances in mass spectrometric analysis as the future means of detecting hormone abuse in cattle. *Trends in Analytical Chemistry* 2009, sous presse.
- Pinel G, Rambaud L, Cacciatore G, Bergwerff A, Elliott C, Nielen M and Le Bizec B. Elimination kinetic of 17 $\beta$ -estradiol 3-benzoate and 17 $\beta$ -nandrolone laureate esters metabolites in calves urine. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2008;110:30-38.
- Pinel G, Maume D, Deceuninck Y, André F, Le Bizec B. Unambiguous identification of thiouracil residue in urine collected in non-treated bovine by tandem and high-resolution mass spectrometry. *Rapid Communication in Mass Spectrometry* 2006;20: 3183-3187.