



Recherche pour la référence

La spectrométrie de masse à haute résolution (SM-HR) pour la recherche de substances médicamenteuses résiduelles

E. Verdon, T. Jagadeshwar-Reddy, D. Hurtaud-Pessel
Anses, Laboratoire de Fougères (France)



Dans le cadre du contrôle réglementaire des substances chimiques à caractère médicamenteux présentes dans les denrées alimentaires d'origine animale, la spectrométrie de masse couplée à des techniques séparatives de type chromatographie gazeuse (CPG-SM) ou liquide (CPL-SM) est devenue la méthode analytique d'excellence par son aptitude à l'identification moléculaire des substances chimiques mais aussi par la confirmation quantifiée de ces substances à l'état résiduel dans les matrices biologiques que sont les produits alimentaires non transformés tels que le lait, la viande, le poisson, la volaille, les œufs ou le miel. Au milieu des années 2000, une évolution spectaculaire de cette technologie s'est fait jour et vient à présent révolutionner le développement méthodologique dans le secteur de l'analyse des résidus chimiques dans les matrices biologiques. En effet, la possibilité ayant été donnée à certains analyseurs grâce à leur pouvoir de résolution de mesurer la masse exacte des substances détectées avec une précision de l'ordre de 1-5 ppm, il est devenu possible d'approcher la formule brute moléculaire jusqu'à déterminer le nombre d'atomes constituant la molécule (technique d'analyse dite de Haute Résolution). De plus, la capacité d'acquisition de tous les signaux générés par l'ensemble des molécules ionisées injectées dans l'instrument (technique dite du « Full Scan ») offre de nouvelles perspectives en termes de traitement du signal. Cette évolution pourrait permettre de propulser le contrôle des substances médicamenteuses dans une ère nouvelle dans laquelle la recherche de ces composés à l'état de trace ne serait plus entreprise sous la forme de plusieurs analyses dites ciblées comme c'est le cas aujourd'hui et pratiquées dans le cadre de méthodes orientées sur une molécule ou encore sur une famille ou classe de molécules (antibiotiques, antiparasitaires, anti-inflammatoires, tranquillisants...). La stratégie consisterait plutôt à pratiquer une analyse « Full Scan » et « Haute Résolution » accédant ainsi à une recherche moléculaire non ciblée dans les extraits biologiques.

Introduction

L'analyse physico-chimique de résidus de traitements (médicaments) ou de contaminants (toxines, polluants organiques) s'effectue de nos jours essentiellement à l'aide de méthodes basées sur des techniques séparatives (chromatographie) avec recueil d'informations spectrales en relation avec les caractéristiques physico-chimiques des composés étudiés. Les techniques de spectrométrie de masse ont évolué très rapidement ces dernières années notamment celles couplées avec des appareils de chromatographie liquide (De Brabander *et al.*, 2009; Verdon, 2009). Plusieurs types de techniques de spectrométrie de masse sont aujourd'hui disponibles sur le marché. La chromatographie liquide couplée à des spectromètres de masse de type quadripolaire en tandem (CL-SM/SM) est plus particulièrement utilisée pour confirmer la présence d'un ou plusieurs composés dans les matrices alimentaires d'origine animale. La CL-SM/SM, utilisée en mode MRM (« Multiple Reaction Monitoring ») ou SRM (« Selective Reaction Monitoring »), permet d'identifier spécifiquement et sélectivement puis de quantifier un ou plusieurs composés présélectionnés. Ce mode, très sélectif, permet un dépistage ciblé d'un nombre fini de composés, mais il ne permet malheureusement pas de mettre en évidence des composés imprévus qui pourraient s'avérer présents dans l'échantillon biologique. Contrairement au mode MRM/SRM, l'analyse de spectre total (ou « full scan ») permet de détecter la présence de tous les composés ionisés, l'analyse est alors dite non ciblée. Dans ce dernier cas le pouvoir résolutif de l'analyseur est primordial; il apporte la précision sur la mesure de la masse exacte de l'ensemble des analytes.

Dans le cadre des travaux de contrôle de résidus de médicaments vétérinaires dans les produits alimentaires d'origine animale, le Laboratoire de l'Anses à Fougères peut être confronté aux différents problèmes suivants:

- mettre en évidence la présence de composés inconnus au sein d'échantillons suspects par comparaison avec le profil d'échantillons témoins (suspicion de fraudes);
 - identifier par une méthode non radioactive, les métabolites issus d'un composé connu dans un échantillon biologique (étude pharmacocinétique inter-espèce, comparaison métabolisme *in vitro/in vivo*);
 - dépister et confirmer la présence de composés ciblés en absence de méthode spécifique pour ce composé et/ou en absence de substances de référence avec l'utilisation d'information bibliographique (formule chimique);
 - valider la présence d'un composé sur la base d'une identification spectrale et d'information structurale sans disposer du composé de référence (identification structurale).
- La résolution de ces problèmes suppose de ne pas cibler les composés à étudier et de disposer:
- d'une capacité de recueillir un spectre complet avec une grande résolution en mesure de masse entre les pics;
 - de mettre en évidence les composés d'intérêt au sein d'un spectre complet;
 - d'une capacité d'analyse sur le composé d'intérêt en ayant une résolution suffisante pour séparer les co-élutants;
 - d'une information fiable sur la masse moléculaire du composé étudié. La connaissance de la masse exacte d'un composé en Dalton (erreur sur la masse inférieure à 2 mDa) permet de proposer des formules chimiques brutes.



Recherche pour la référence

- d'une information sur la structure moléculaire du composé étudié issue d'une analyse structurale en spectrométrie de masse (fragmentation);
- d'une capacité à recueillir une information identique dans le temps et de stocker les spectres totaux pour un réexamen en cas d'acquisition de nouvelles informations.

Le présent article s'attache d'abord à poser la problématique de l'analyse de résidus de médicaments vétérinaires et la réglementation qui la contrôle puis conduit dans un second temps à présenter quelques exemples d'application du CL-SMHR de type LTQ-Orbitrap. Ces exemples illustrent sa capacité de résolution de problèmes analytiques notamment grâce à l'identification moléculaire de composés inconnus que seul peut prétendre aborder un appareil doté de la haute résolution et de la capacité de réanalyse du signal spectral « full-scan » stocké en mémoire notamment à l'aide de logiciels de traitement du signal adaptés.

Problématique des résidus de médicaments vétérinaires et réglementation européenne

L'administration de produits vétérinaires autorisés aux animaux de rente peut conduire à la présence de résidus dans l'aliment d'origine animale consommé par l'Homme comme par exemple dans la viande mais aussi encore dans le lait, la volaille, le poisson d'élevage ou les œufs. Faisant suite à un besoin croissant de sécurité sanitaire des aliments, le contrôle des résidus de substances médicamenteuses vétérinaires est devenu un sujet de première préoccupation réglementaire notamment dans l'Union européenne. Pour sauvegarder la santé humaine, des niveaux de tolérance encore appelés limites maximales de résidus (LMRs) dans les produits alimentaires ont été établis dans plusieurs pays de par le monde. Dans l'Union européenne, la fixation des LMRs est fixée par un règlement (Règlement n° 470/2009/CE) récemment établi en remplacement d'un règlement datant de 1990 (Règlement n° 2377/90/CE). Ces limites interviennent en soutien à la réglementation pour le contrôle de la sécurité alimentaire au regard des résidus de médicaments vétérinaires dans les tissus ou fluides d'animaux de rente qui entrent dans la chaîne alimentaire humaine. Pour s'assurer que l'alimentation est exempte de tout résidu à des concentrations potentiellement nuisibles à la santé de l'Homme, ces LMRs sont calculées à partir de données toxicologiques et prennent en compte des coefficients de sécurité s'élevant d'un facteur 10 à 100 en fonction de la molécule considérée et de sa dangerosité. Un autre règlement (Règlement n° 37/2010/CE) établit la liste de ces molécules. Sous forme de deux tableaux, il reprend dans l'ordre alphabétique des substances l'ensemble des molécules chimiques médicamenteuses autorisées ou bien interdites dans l'Union européenne ainsi que les limites maximales auxquelles celles-ci peuvent être légalement retrouvées dans les aliments d'origine animale.

De ce fait, la surveillance des résidus de médicaments vétérinaires dans l'alimentation représente un devoir de chaque état membre assujéti à la législation européenne. Dans le principe, il existe deux types de programmes réglementaires de surveillance de ces résidus. L'un s'attache au contrôle direct et ciblé à l'endroit où l'animal est élevé (fermes, piscicultures) ou abattu (abattoirs) ou bien où son produit est collecté (laiteries). L'animal ou son produit est alors consigné par les services vétérinaires compétents jusqu'à ce que la preuve de sa sécurité sanitaire soit apportée par une analyse appropriée. L'autre type de programme consiste à mettre en œuvre un plan national

de contrôle de résidus (PNCR) qui a pour objectif d'évaluer le taux de conformité de la production globale nationale sans toutefois rejeter les animaux et leurs produits hors du marché mais en laissant la possibilité aux services vétérinaires de réaliser des contrôles renforcés si ce taux de conformité venait à décroître. Ce système de surveillance est décrit au niveau communautaire dans une directive (Directive n° 96/23/CE) reprise plus récemment dans le cadre du règlement régissant les contrôles officiels mis en place pour assurer la vérification de la conformité de la loi européenne sur l'alimentation humaine, sur les aliments pour animaux, sur la santé animale et sur les règles de bien-être des animaux de rente (Règlement n° 882/2004/CE).

Cette directive 96/23/CE décrit la quantité d'échantillons à contrôler dans chaque espèce productrice d'aliment (bovins, porcins, caprins, ovins, volaille, gibiers, poissons, crustacés...) ainsi que dans leurs produits (lait, œufs, miel). Elle détermine également les différents groupes de médicaments résiduels à contrôler (antimicrobiens, anabolisants, antiparasitaires...). Dans les deux types de surveillances, les échantillons positifs (non conformes) ou suspects doivent pouvoir être efficacement séparés de l'ensemble des échantillons négatifs (conformes). La base scientifique et technique de ces contrôles réside dans le développement, la validation et l'application de méthodes analytiques adaptées aux critères et aux exigences liés à ces réglementations et décrites dans une décision communautaire et deux guidelines (Décision n° 2002/657/CE; Guidelines SANCO/2004/2726 rev4; Guidelines from EURL of 20 January 2010).

Stratégies d'analyse en mode ciblé ou en mode non ciblé?

De nos jours, le panel d'instruments de chromatographie liquide couplés à des détecteurs de spectrométrie de masse (CL-SM) utilisés en analyse des résidus chimiques dans les matrices biologiques est particulièrement étendu et varié.

Les technologies de SM les plus répandues et utilisées par les laboratoires d'application pour la confirmation de résidus de médicaments vétérinaires sont les systèmes de type triple quadrupolaire (QqQ), avec plus rarement les systèmes CL-SM à trappe ionique (IT) ou CL-SM hybridés quadrupôle-trappe ionique (QTrap). Ces systèmes sont dédiés à l'analyse de confirmation quantitative ciblée et ils offrent alors une haute sensibilité et une sélectivité élevée. Dans ce cas les analytes sont pré-sélectionnés avant l'acquisition. Les paramètres d'acquisition sont optimisés afin de ne détecter que les composés inclus dans la liste de détection « pré-ciblée ». Ces systèmes permettent des analyses à une résolution massique unitaire (0,5 à 1 Da). Ils ont une sensibilité élevée en mode ciblé (MRM) pour l'identification de composés recherchés dans les matrices biologiques mais présentent une faible sensibilité en mode full-scan. De nombreuses méthodes dédiées à l'analyse de composé unique ou multiple (multi-résidu) ont été développées ces dix dernières années pour être utilisées pour les contrôles officiels.

Plus récemment, de nouvelles approches basées sur la spectrométrie de masse à haute résolution, font appel à des appareils munis de détecteurs de type temps de vol (ToF) ou à trappe ionique orbitale (Orbitrap). Ces systèmes combinés ou non aux précédentes technologies (ToF, Q-ToF, Orbitrap, LTQ-Orbitrap...) possèdent un pouvoir résolutif pouvant atteindre 20000 FWHM (ToF) et monter aujourd'hui jusqu'à 100000

Recherche pour la référence

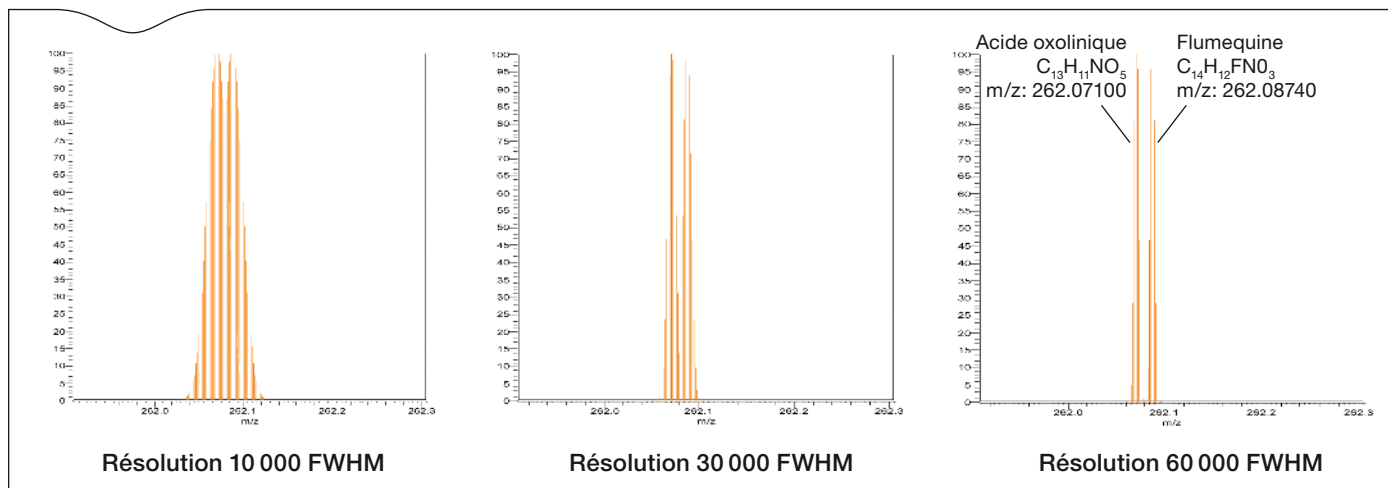


Figure 1. Spectre de masse simulé à différentes résolutions pour un mélange de composés isobariques contenant la flumequine $C_{14}H_{12}FNO_3$ et l'acide oxolinique $C_{13}H_{11}NO_5$ de masse exacte respective m/z : 262.08740 et m/z : 262.07100

FWMH (orbitrap). Ce pouvoir résolutif leur permet d'avoir une précision sur la masse exacte du composé analysé de l'ordre de 1 à 5 ppm à comparer avec un appareil dit de basse résolution (ou de masse unitaire) pour lequel la précision sur la masse exacte ne dépasse pas 1 000 ppm. La résolution est la capacité d'un instrument à séparer 2 ions de masse voisine (Figure 1). Plus la résolution est élevée, plus la précision en masse sera bonne. L'acquisition en mode full-scan enregistre tous les ions obtenus dans la source, sans présélection des composés. La sélectivité repose sur la masse exacte des ions des composés. L'analyse rétrospective des données acquises est possible, sans limitation théorique dans le nombre de composés à rechercher. Ces systèmes offrent 2 approches analytiques différentes pour la recherche de composés résiduels :

1. l'approche ciblée: recherche de composés connus. À partir de l'acquisition en mode full-scan d'un extrait biologique, il est possible d'extraire la trace chromatographique d'un ion spécifique. Le chromatogramme obtenu présentera un pic chromatographique seulement pour la masse exacte demandée, sans interférence des autres composés présents dans la matrice. Plus la fenêtre d'extraction de masse est réduite (3 ppm), plus le chromatogramme est débarrassé des ions interférant isobariques. L'apport de « pseudo fragmentation » permet de plus de générer des ions fragments qui offrent un critère supplémentaire de confirmation de l'identification des composés recherchés ;

2. l'approche non-ciblée: recherche de composés inconnus. La recherche de composés inconnus, c'est-à-dire de composés sans information *a priori* sur l'identité chimique des composés à détecter est aussi réalisable à partir des acquisitions en mode full-scan, en utilisant la sélectivité des systèmes LC-HRMS et en travaillant les fichiers acquis avec des logiciels de comparaison de données. Cette approche métabolomique basée sur la spectrométrie de masse repose sur la comparaison de signaux acquis sur plusieurs groupes d'analyses répétées (1 groupe contrôle et 1 groupe traité) à l'aide d'outils informatiques de chimiométrie afin de mettre en évidence des différences significatives. Ces différences (ions m/z) peuvent porter sur des substances ou métabolites apparaissant discriminants lors de l'analyse statistique. Une

difficulté majeure de cette approche est de garantir que la différence observée provient bien des empreintes acquises et n'est pas due à la variabilité analytique. Une autre difficulté repose ensuite sur la confirmation de l'identité chimique de ces substances, qui peuvent être des biomarqueurs potentiels d'un traitement. En effet, à partir d'un ion de masse exacte m/z , même avec une précision de masse de 5 ppm, il reste difficile de déterminer une formule chimique brute unique, c'est-à-dire de dénombrer les atomes de carbone, d'oxygène, d'azote, d'hydrogène et des autres composés de la classification périodique, présents dans l'objet d'analyse de façon univoque. Des recherches des structures compatibles sont possibles à partir des banques de données de plus en plus nombreuses mises en accès plus ou moins libre sur certains sites universitaires et autres accessibles *via* Internet. Des analyses complémentaires par fragmentation sur une ou des molécule(s) hypothétique(s) sont souvent nécessaires pour confirmer les hypothèses formulées. Cependant, plus la résolution en masse de l'instrument croît (de 15 000 à 100 000 FWHM) ou encore plus l'erreur en masse décroît (de 10 ppm à 1 ppm) et plus le nombre de formules chimiques compatibles sera restreint ; permettant ainsi de baptiser la molécule inconnue détectée avec suffisamment de crédibilité pour ce choix.

Les exemples suivants donnent un simple aperçu des applications extraordinairement variées que ces instruments nous permettent d'envisager.

Exemple d'application n° 1. Identification de métabolites et de produits de dégradation en mode ciblé et en mode non ciblé – cas de la recherche dans la chair de poisson d'élevage de traces métabolisées d'un colorant, le vert brillant (Figure 2)

Pour donner une idée plus précise de ces nouveautés en recherche analytique de traces chimiques dans les matrices biologiques, un premier exemple traité au laboratoire de Fougères concerne les colorants à usage thérapeutique non autorisés dans l'Union européenne bien qu'assez largement utilisés autrefois dans nos piscicultures et autres fermes

Recherche pour la référence

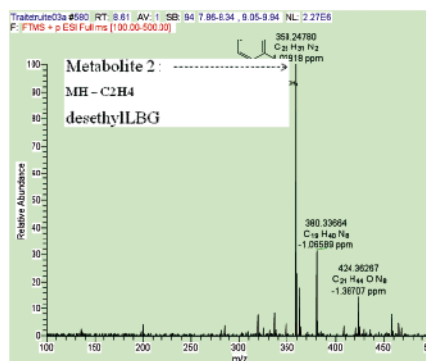
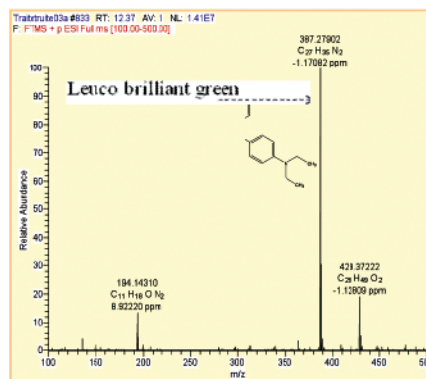
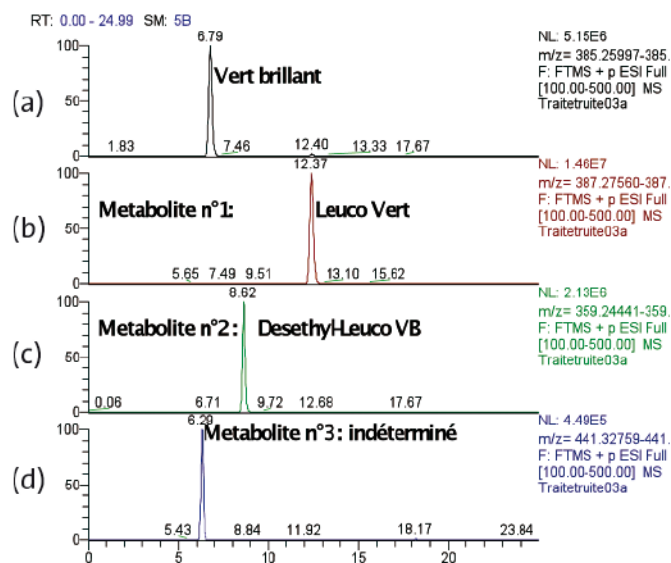


Figure 2. Chromatogrammes FTMS full-scan (résolution 60000) d'un extrait de truite traité au Vert brillant.

(a) Chromatogramme de l'ion extrait de masse m/z 385.26382 correspondant au vert brillant.

(b) Chromatogramme de l'ion extrait de masse m/z 387.27947 correspondant au leuco vert brillant.

(c) Chromatogramme de l'ion extrait de masse m/z 359.24774 correspondant au desethyl-leucovert brillant.

(d) Chromatogramme de l'ion extrait de masse m/z 441.3300 correspondant à un métabolite supposé de vert brillant.

d'élevage aquacole à des fins de traitement désinfectant, fongicide, et antimicrobien. Toujours autorisé et en vente libre pour les poissons d'ornement, le vert de malachite est l'un de ces colorants de la famille des triarylméthanés qui présente par ailleurs des effets toxiques suffisamment importants pour ne pas être autorisable pour les produits d'aquaculture (poissons, crustacés) destinés à se retrouver dans nos assiettes. Son contrôle est donc réglementé dans l'UE et des méthodes d'analyses notamment par CL-SM en tandem à basse résolution ciblent déjà la recherche dans les poissons d'élevage de ce colorant et surtout de son composé métabolisé, le leuco vert de malachite. Récemment, suite à des soupçons sur la substitution du vert de malachite par un autre colorant dans des produits aquacoles importés d'Amérique du sud et d'Asie, les méthodes de contrôle européennes ont été étendues à un second produit colorant nommé le violet de gentiane (aussi appelé cristal violet dans les pays anglo-saxons). Une méthode intégrant le vert de malachite et sa leucobase ainsi que le violet de gentiane et sa propre leucobase a ainsi été développée par le Laboratoire de référence national et européen de l'Anses à Fougères et s'utilise depuis près de trois ans dans la quasi-totalité des laboratoires de contrôle de l'Union européenne. Très récemment, la possible présence dans certains produits aquacoles de vert brillant, un troisième colorant de la même famille des triarylméthanés, a été évoquée mais sans jamais avoir pu être démontrée par les méthodes ciblées actuellement

en place pour le contrôle. Ainsi, le laboratoire de Fougères s'est intéressé à évaluer la possibilité de contrôler le vert brillant dans les produits d'aquaculture et a proposé une étude permettant de rechercher la présence de métabolites de ce composé dans la chair de poissons. Premièrement, par similitude avec les autres composés triarylméthanés, nous avons voulu vérifier l'hypothèse de la présence de leuco vert brillant dans des truites ayant subi un traitement au vert brillant; ce composé n'ayant jamais été confirmé dans de précédentes études (Andersen *et al.*, 2009). Ensuite, nous avons recherché sur l'animal la présence d'autres métabolites issus de ce traitement. L'expérimentation a concerné un lot de truites traitées au vert brillant. Ce lot a été comparé à un lot de truites non traitées. Après une extraction chimique opérée sur les échantillons de chair de truite récoltés, des analyses par CL-SM à haute résolution ont été entreprises à l'aide d'un LTQ-Orbitrap (hybride trappe linéaire et trappe orbitale) calibré en mode « Full Scan » (résolution de « 60 000 » FWHM). Deux approches de traitement du signal étaient envisagées. L'une, en mode ciblé, consistait à extraire de l'ensemble des signaux des chromatogrammes obtenus en courant ionique total (TIC) ceux attribuables à la masse exacte des composés recherchés, à savoir les 2 ions moléculaires caractéristiques du vert brillant et de sa leucobase (métabolite principal recherché *a priori*). L'autre approche, en mode non ciblé, a consisté à utiliser l'ensemble des signaux obtenus à partir des échantillons d'un lot de truites traitées au vert brillant et à les comparer à l'aide de logiciels



Recherche pour la référence

adaptés (ex: Sieve®) à ceux obtenus avec le lot de truites témoins.

La première approche a permis de mettre en évidence de façon irrévocable la présence du vert brillant mais surtout aussi de sa leucobase affichant une masse (m/z) de 387,27902 pour une masse théorique (m/z) attendue à 387,27947 (Figure 2). La précision en masse affichait un écart de 1,17 ppm indiquant ainsi la très forte probabilité de présence du métabolite. Celui-ci a ensuite pu être confirmé en CL-SM sur le LTQ-Orbitrap, à l'aide d'analyses complémentaires réalisées en mode fragmentation d'une part, et dans les mêmes conditions, par la comparaison avec son standard pur obtenu par synthèse chimique et dont le spectre en masse correspondait très exactement à celui de la molécule métabolisée retrouvée chez la truite traitée.

La seconde approche en mode non ciblé a également permis de confirmer la présence du métabolite principal du vert brillant chez la truite traitée. Le retraitement effectué dans Sieve® était basé sur des données obtenues avec le LTQ-Orbitrap en « Full Scan » à un niveau de résolution en masse de 60 000 FWHM à partir des 12 échantillons provenant des 2 lots de truites traitées et non traitées. Ce logiciel permet de mettre en évidence des différences de signaux entre le groupe d'animaux non traités et le groupe d'animaux traités et ainsi de fournir une liste d'ions (composés) présents dans un groupe et non dans l'autre. Cette approche (Figure 2) a permis d'extraire puis de confirmer parmi l'ensemble des chromatogrammes de masse obtenus à haute résolution la présence du vert brillant, du leuco vert brillant et également d'identifier la présence d'autres composés métabolisés dont l'un a pu être formellement décrit comme le deséthyl-leuco-vert brillant et un autre probablement en concentration plus faible pour une masse comprise entre 441,32759 et 441,33641 dont nous n'avons pu jusqu'à présent aboutir à une identification complète de la molécule (Hurtaud-Pessel *et al.*, 2009 & 2011).

Exemple d'application n° 2. Dépistage en mode ciblé et en mode non ciblé pour l'identification de résidus d'antibiotiques dans la viande (Figure 3)

Un autre exemple, que nous avons pu récemment expérimenter au laboratoire de Fougères, caractérise bien l'évolution

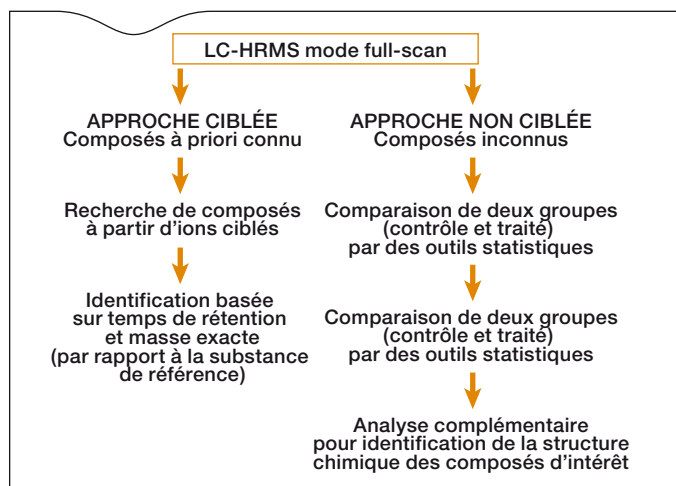


Figure 3. Logigramme comparant une approche ciblée et une approche non ciblée

stratégique actuelle en matière d'analyse de biotraceurs ou biomarqueurs de molécules vétérinaires dans les denrées alimentaires d'origine animale. Il concerne le dépistage d'un ensemble de familles d'antibiotiques de première importance qui peuvent à présent être identifiés de façon irrévocable dans les produits carnés à l'aide d'une méthode par CL-SM hybride en « Full scan » et à Haute Résolution. Là encore, deux approches de traitement du signal ont été envisagées. L'une, ciblée, consistait à intégrer dans une seule et même méthode d'acquisition puis de retraitement de données, l'ensemble des signaux des chromatogrammes obtenus en courant ionique total (TIC) pour une collection de 60 traces moléculaires d'antibiotiques autorisés en UE, antibiotiques autorisés moyennant un contrôle de leur présence dans la viande à des niveaux inférieurs aux limites maximales de résidus (LMRs) réglementaires. Cette approche a été largement améliorée et simplifiée par l'emploi d'un logiciel spécifique (ToxID®) permettant de constituer une liste comportant tous les éléments principaux utiles à leur dépistage, c'est-à-dire à minima le couple masse exacte, temps de rétention chromatographique, caractéristique de chacune des 60 traces d'antibiotiques (Figure 4). Elle a été testée avec succès sur plusieurs échantillons réellement contaminés de viandes de bœuf, de porc et de volaille. La méthode est en cours de validation au Laboratoire de référence pour les résidus

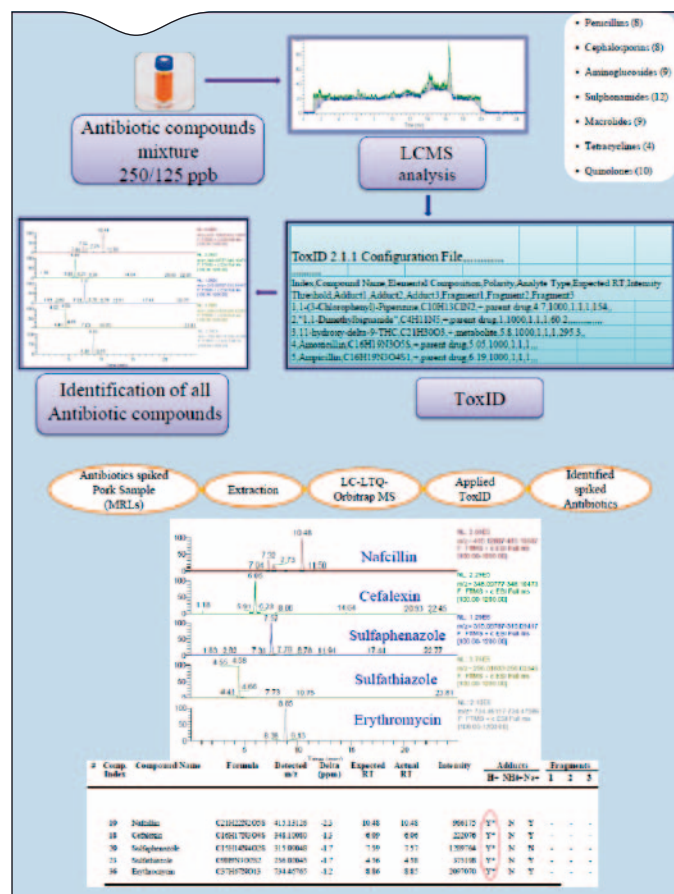


Figure 4. Principe de la recherche en « full scan » à haute résolution en approche ciblée pour un mélange de résidus d'antibiotiques

Recherche pour la référence

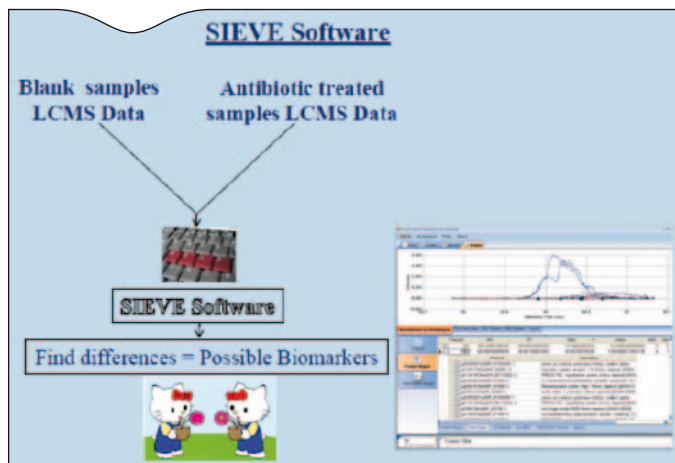


Figure 5. Principe de la recherche en « full scan » à haute résolution en approche non ciblée avec analyse d'expression différentielle semi-quantitative

de médicaments vétérinaires (Laboratoire Anses de Fougères). Il est prévu de développer pour obtenir une méthode non plus seulement orientée multi-antibiotiques mais également multi-classes de médicaments vétérinaires incluant si possible les antiparasitaires, les anti-inflammatoires, les anticoccidiens et les tranquillisants.

L'autre approche, dite « non ciblée », a consisté à utiliser toute la puissance de l'analyse à haute résolution en masse pour réussir à extraire à partir des chromatogrammes obtenus dans le mode « Full Scan », les signaux interprétables en termes de formulation chimique. Ils ont pu être comparés à ceux générés et stockés dans les banques de données internationales, de plus en plus nombreuses, mises à disposition via le réseau Internet. Plusieurs types d'études peuvent être entrepris, considérant le potentiel d'analyse des appareils de haute résolution allié à la puissance de l'informatique actuelle. L'une des premières études de ce genre que nous avons ainsi développée au Laboratoire de l'Anses à Fougères pour la recherche non ciblée de traces d'antibiotiques a concerné la comparaison des signaux acquis pour un échantillon réel de viande de bœuf préalablement dépisté positif par une méthode d'analyse microbiologique de l'inhibition bactérienne par diffusion en gélose. Les signaux obtenus en analyse « Full Scan » pour l'échantillon ont été comparés à un ensemble de signaux obtenus à partir d'échantillons provenant de divers lots d'animaux de même espèce et n'ayant subi aucune contamination volontaire ou involontaire par un médicament vétérinaire (Figure 5).

La comparaison faite à l'aide d'un logiciel d'analyse d'expression différentielle semi-quantitative (Sieve®) a permis d'extraire de l'échantillon réel dépisté positif, certains signaux révélateurs de la présence d'un traitement vétérinaire (présence de la molécule parente et de ses métabolites) qu'il a été ensuite possible d'identifier formellement par une comparaison avec les standards de référence du produit considéré. Ce type d'analyse a été mené ensuite au laboratoire à plusieurs reprises sur des échantillons officiels de muscles dépistés positifs et prélevés dans diverses espèces: bœuf, porc, volaille et lapin (Jagadeshwar-Reddy *et al.*, 2011). Cette étude nous a ainsi montré la richesse des possibilités offertes par

ce type d'approche. Elle nous a également indiqué certaines des difficultés rencontrées sur le chemin de la recherche de biomarqueurs révélateurs des traitements médicamenteux.

Conclusion

Le système de contrôle et de surveillance des résidus de substances chimiques dans les matrices biologiques à la base de notre alimentation est toujours actuellement basé sur des méthodes d'analyse qui ciblent les molécules ou des familles de molécules. Toutefois, cette approche ciblée commence à être mise en compétition avec des technologies innovantes dans les laboratoires de recherche et de développement du contrôle futur. En effet, la puissance d'analyse qu'apportent lorsqu'ils sont utilisés en « Full Scan » permet à présent d'envisager une tout autre stratégie de recherche des résidus chimiques dans les produits alimentaires. L'identification moléculaire par la mesure de masse exacte permet ainsi d'avancer vers la recherche des métabolites et produits de dégradation de ces substances. Elle oriente les méthodes vers la compréhension des mécanismes à l'œuvre dans la recherche des biomarqueurs cibles des traitements vétérinaires; que ceux-ci soient autorisés avec des limites maximales de résidus réglementaires ou bien illégaux sous forme de mésusages ou de fraudes. Elle permettrait aussi probablement d'envisager les futures propositions de modification du système de surveillance en sécurité alimentaire avec l'évolution des méthodes d'analyse chimique du mode ciblé vers des modes non-ciblés comme nos deux exemples présentés ci-dessus le montrent; l'un pour des colorants dans les poissons d'élevage et l'autre pour des résidus de plusieurs familles d'antibiotiques dans les viandes de boucherie. L'évolution et l'ouverture de ces méthodes à d'autres substances médicamenteuses n'ont de limite que celle de la grande diversité des chimies de ces composés que constituent les différentes classes de médicaments vétérinaires auxquelles l'on peut ajouter aussi d'autres composés chimiques potentiellement présents dans les aliments.

Références bibliographiques

- Andersen W.C., Turnipseed S.B., Karbiwnyk C.M., Lee R.H., Clark S.B., Rowe W.D., Madson M.R., Miller K.E., 2009, Multiresidue method for the triphenylmethane dyes in fish: Malachite green, crystal (gentian) violet, and brilliant green, *Analytica Chimica Acta*, 637, 279.
- Batemann K.P., Kellmann M., Muenster H., Papp, R., Taylor L., 2009, Quantitative-Qualitative Data Acquisition Using a Benchtop Orbitrap Mass Spectrometer, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 1441, 20, 8.
- De Brabander H., Noppe H., Verheyden K., VandenBussche L., Wille K., Okerman L., Vanhaecke L., Reybroeck W., Ooghe S., Croubels S., 2009, Residue analysis: Future trends from a historical perspective, *Journal of Chromatography A*, 7964, 1216.
- Décision (CE) N° 2002/657 de la Commission du 12 août 2002 portant modalités d'application de la directive 96/23/CE du Conseil en ce qui concerne les performances des méthodes d'analyse et l'interprétation des résultats.
- Directive N°96/23/CE du Conseil du 29 avril 1996 relative aux mesures de contrôle à mettre en œuvre à l'égard de certaines substances et de leurs résidus dans les animaux vivants et leurs produits et abrogeant les directives 85/358/CEE et 86/469/CEE et les décisions 89/187/CEE et 91/664/CEE.
- Erve J.C.L., Gu M., Wang Y., DeMaio W., Talaat R.E., 2009, Spectral Accuracy of Molecular Ions in an LTQ/Orbitrap Mass Spectrometer and Implications for Elemental Composition Determination, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2058, 20, 8.



Recherche pour la référence

Cahier numéro 5
Été 2011

Gaugain-Juhel M., Delepine B., Gautier S., Fourmond M.P., Gaudin V., Hurtaud-Pessel D., Verdon E., Sanders P., 2009, Validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry screening method to monitor 58 antibiotics in milk: a qualitative approach, *Food Additives & Contaminants*, 1459, 26, 11

Granelli, K. and Branzell C., 2007, Rapid multi-residue screening of antibiotics in muscle and kidney by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, 289, 586.

Guidelines SANCO/2004/2726 rev4 of December 2008: Guidelines for the Implementation of Decision 2002/657/EC.

Guidelines from CRLs of 20 January 2010: Guidelines for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines (initial validation and transfer).

Hurtaud-Pessel D., Jagadeshwar-Reddy T., Verdon E., 2009, LTQ-Orbitrap - An instrument dedicated to multi-functional search in molecular chemistry, Oral communication at the AOAC European Section International Symposium on New Trends in Food Analyses from LC-MS technologies to UPLC, Paris, Novembre 2009.

Hurtaud-Pessel D., Couëdor P., Verdon E., 2011, Liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the determination of dye residues in aquaculture products: development and validation, *Journal of Chromatography A*, 1218(12), 1632-1645.

Jagadeshwar-Reddy T., Hurtaud-Pessel D., Verdon E., 2009, The LTQ-Orbitrap mass spectrometer: Identification of antibiotic residues in biological matrices, Oral communication at the AOAC European Section International Symposium on New Trends in Food Analyses from LC-MS technologies to UPLC, Paris, Novembre 2009.

Jagadeshwar-Reddy, T., Hurtaud-Pessel, D., Verdon, E., 2011, Identification of penicillin-G and its metabolites in Bovine Muscle using Liquid chromatography coupled with High resolution LTQ-ORBITRAP mass spectrometer, Article soumis à *Rapid Communication in Mass Spectrometry*.

Kaufmann A., Butcher P., Maden K., Widmer M., 2008, Quantitative multiresidue method for about 100 veterinary drugs in different meat matrices by sub 2- μ m particulate high-performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 66, 1194.

Kaufmann A., 2009, UPLC-HRMS: A tool for multi-residue veterinary drug methods, Oral communication at the AOAC European Section International Symposium on New Trends in Food Analyses from LC-MS technologies to UPLC, Paris, Novembre 2009.

Kaufmann A., Butcher P., Maden K., Widmer M., 2011, Development of an improved high resolution mass spectrometry based multi-residue method for veterinary drugs in various food matrices, *Analytica Chimica Acta*, in press, doi:10.1016/j.aca.2010.11.034.

Le Bizec, B., Monteau F., Bichon E., Prevost S., Courant F., Pinel G., Antignac J.P., 2009, Linear Quadrupole Ion Trap Fourier Transform (LTQ-ORBITRAP) to Fight Against the Illegal Use of Growth Promoters in Cattle, Oral communication at the AOAC European Section International Symposium on New Trends in Food Analyses from LC-MS technologies to UPLC, Paris, Novembre 2009.

Lim H.K., Chen J., Sensenhauser C., Cook K., Subrahmanyam V., 2007, Metabolite identification by data-dependent accurate mass spectrometric analysis at resolving power of 60,000 in external calibration mode using an LTQ/Orbitrap, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1821, 21.

Makarov A., Denisov E., Lange O., Performance Evaluation of a High-field Orbitrap Mass Analyzer, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 1391, 20, 8, 2009.

Munoz P., Blanca J., Ramos R., Bartolomé M., Garcia E., Mendez N., Gomez J., Martin de Pozuelo M., 2005, A versatile liquid chromatography-tandem mass spectrometry system for the analysis of different groups of veterinary drugs, *Analytica Chimica Acta*, 137, 529.

Nielen M.W.F., vanEngelen M.C., Zuiderent R., Ramaker R., 2007, Screening and confirmation criteria for hormone residue analysis using LC accurate mass time-of-flight, Fourier transform ion cyclotron resonance and orbitrap mass spectrometry techniques, *Analytica Chimica Acta*, 122, 586.

Ortelli D., Cognard E., Jan P., Edder P., 2009, Comprehensive fast multiresidue screening of 150 veterinary drugs in milk by ultra-performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*, 2369, 877.

Peters R.J.B., Bolck Y.J.C., Rutgers P., Stolker A.A.M., Nielen M.W.F., 2009, Multi-residue screening of veterinary drugs in egg, fish and meat using high-resolution liquid chromatography accurate mass time-of-flight mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 8206, 1216 {5748}.

Règlement (CE) N°470/2009 du Parlement Européen et du Conseil du 6 mai 2009 établissant des procédures communautaires pour la fixation des limites de résidus des substances pharmacologiquement actives dans les aliments d'origine animale, abrogeant le règlement (CEE) n°2377/90 du Conseil et modifiant la directive 2001/82/CE du Parlement européen et du Conseil et le règlement (CE) n°726/2004 du Parlement européen et du Conseil.

Règlement (CEE) N°2377/90 du Conseil du 26 juin 1990 établissant une procédure communautaire pour la fixation des limites maximales de résidus de médicaments vétérinaires dans les aliments d'origine animale.

Règlement (UE) n°37/2010 de la Commission du 22 décembre 2009 relatif aux substances pharmacologiquement actives et à leur classification en ce qui concerne les limites maximales de résidus dans les aliments d'origine animale.

Règlement (CE) N° 882/2004 du Parlement Européen et du Conseil du 29 avril 2004 relatif aux contrôles officiels effectués pour s'assurer de la conformité avec la législation sur les aliments et les denrées alimentaires et avec les dispositions relatives à la santé animale et au bien-être des animaux.

Stolker A.A.M., Zuidema T., Nielen, M.W.F., 2007, Residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents, *Trends in Analytical Chemistry*, 967, 26, 10.

Stubbings G., Bigwood T., 2009, The development and validation of a multiclass liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) procedure for the determination of veterinary drug residues in animal tissue using QuEChERS approach, *Analytica Chimica Acta*, 68, 637.

Turnipseed S., Storey J.M., Clark S.B., Miller K.E., 2011, Analysis of Veterinary Drugs and Metabolites in Milk Using Quadruple Time-of-Flight Liquid Chromatography – Mass Spectrometry, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, in Press, DOI: 10.1021/jf103808t.

Verdon E., 2009, Antibiotic Residues in Muscle Tissues of Edible Animal Products. Chapitre 42 dans "Handbook of Muscle Tissues of Edible Animal Products". Editeurs L.M.L. Nollet & F. Toldra, CRC Press, Taylor and Francis Group, LLC, pp 855-947.

Zomer P., Schoutsen F. Mol H., 2009, Chemical screening of contaminants in the food chain using LC- high resolution Orbitrap-Mass Spectrometry, Communication at the 4th International Symposium on Recent Advances in Food Analysis (RAFA), Prague, Novembre 2009.