

Identification de biomarqueurs potentiels de l'administration d'hormones naturelles dans l'espèce bovine par profilage stéroïdomique

S. Anizan(1) • E. Bichon(2) • L. Lethuaut(2) • C. Marzin(2) • F. Monteau(1) • T. Serot(2) • J.-P. Antignac(1,3)
C. Prost(2) • B. Le Bizec(1)

(1)ONIRIS, USC 2013, LABERCA, Nantes • (2)ONIRIS, UMR CNRS GEPEA 6144, LBAI, Nantes • (3)INRA, Nantes

L'utilisation de promoteurs de croissance tel que les hormones stéroïdiennes chez les animaux de rente est prohibée au sein de l'Union Européenne (96/22/EC). De telles substances représentent toujours un vrai challenge pour les scientifiques en charge de leur contrôle. Ainsi, si pour des composés xénobiotiques stricts, des méthodes efficaces sont mise en œuvre pour dépister ou confirmer une fraude (via la GC-MSn ou LC-MSn), il en est autrement pour le dépistage d'un abus de stéroïdes naturels comme l'estradiol, la testostérone ou encore l'androstenedione. En effet les concentrations urinaires en métabolites directs de stéroïdes naturels (comme la 17 α -estradiol, la 17 α -testostérone ou l'étiocolanolone) observée chez des bovins non traités sont trop variables pour envisager la fixation d'un seuil de suspicion d'administration fiable. Parallèlement, une administration d'esters de testostérone par exemple, n'induit pas une fluctuation significative de la concentration de ses métabolites urinaires. La seule présence de ces composés ne permet donc pas de suspecter une administration. Ainsi de nouvelles approches dites « omic » basées sur l'analyse non ciblée de la totalité ou d'une fraction de l'échantillon pourraient permettre de révéler de nouveaux métabolites potentiellement biomarqueurs d'une administration frauduleuse.

Appliquée à l'urine de bovin, une approche de type stéroïdomique a été mise en place portant sur 2 fractions d'intérêt de la matrice urinaire : d'une part les métabolites de phase I et d'autre part ceux de phase II. Ce choix part du postulat que certaines voies métaboliques pourraient être affectées de manière préférentielles après administration d'un stéroïde et ainsi moduler des métabolites potentiellement marqueurs issus d'une fonctionnalisation (phase I) ou d'une conjugaison (phase II).

Deux méthodes analytiques ont donc été développées à ces fins impliquant la standardisation des échantillons, une étape de purification ciblée sur la fonction d'intérêt (MEPS C18 ou SPE SAX) et une méthode d'analyse adaptée. Ainsi les métabolites de phase I ont été analysés par GC-qMS et GCxGC-ToF tandis que ceux de phase II ont été analysés par UPLC-MS/MS en mode MRM ou en mode précurseurs ion scan caractéristiques

des groupements sulfates (m/z 97) et glucuronides (m/z 113). Les données ont ensuite été retraitées (extraction, alignement et quantification des pics) et analysées statistiquement (ACP, PLS). Pour les 2 fractions considérées, des signaux identifiés par leur(s) temps de rétention et leur rapport m/z se sont dégagés comme discriminants les populations d'animaux traités et non traités.

Ainsi la spectrométrie de masse apparaît comme un puissant outil permettant par des analyses ciblées (mode MRM) une meilleure compréhension du métabolisme et par des analyse non ciblées (mode scan ou parent scan) de dégager de potentiels biomarqueurs. En outre, la complémentarité des instruments utilisés et des modes d'acquisitions choisis dans cette étude (GC-qMS vs GCxGC-ToF, GC vs LC et MRM vs parent scan) permettent d'une part de couvrir une majeure partie des métabolites pertinents et d'autre part de fournir des informations nécessaires à l'élucidation structurale des potentiels biomarqueurs mis en évidence.