

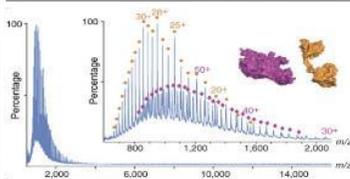
Améliorer le diagnostic des polluants organiques  
 environnementaux :

Mise en œuvre d'approches d'analyses non-ciblées

# Développement, Validation et Accréditation de stratégies non-ciblées

## Application à la gestion du risque chimique dans les aliments

Ministère de l'Agriculture, 6 février 2018



Laboratoire d'Étude des Résidus et Contaminants dans les Aliments (LABERCA)  
 UMR INRA 1329, Oniris, Université Bretagne-Loire  
 BP 50707, 44307 Nantes Cedex 3, France - [www.laberca.org](http://www.laberca.org)

**Gaud DERVILLY, Dr, HDR**

Anne-Lise ROYER,  
 Fabrice MONTEAU,  
 Stéphanie PREVOST,  
 Bruno LE BIZEC





**I. DEFI INITIAL ET STRATEGIE**

**II. MISE EN EVIDENCE & VALIDATION DE MARQUEURS D'EFFET**

**III. ACCREDITATION - ACCEPTABILITE DE L'APPROCHE**

**IV. MISE EN ŒUVRE & CONCLUSION**



## **I. DEFI INITIAL ET STRATEGIE**

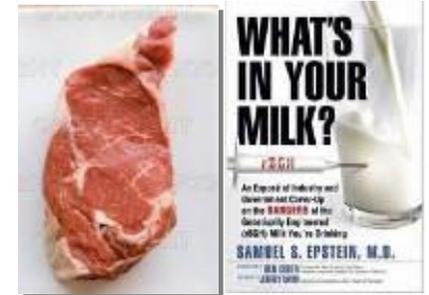
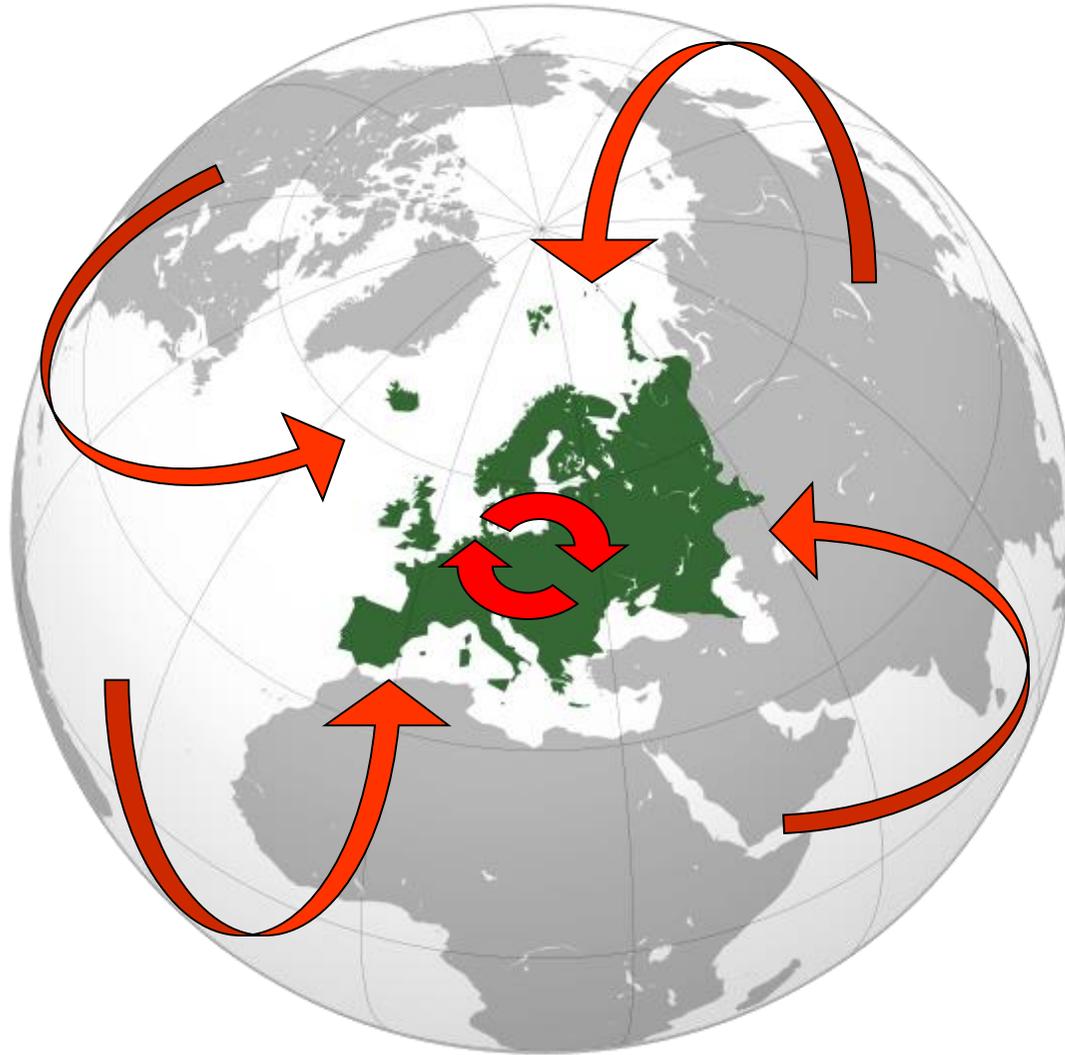
II. MISE EN EVIDENCE & VALIDATION DE MARQUEURS D'EFFET

III. ACCREDITATION - ACCEPTABILITE DE L'APPROCHE

IV. MISE EN ŒUVRE & CONCLUSION

# 1. DEFI INITIAL ET STRATEGIE

## 1.1 Contexte



Dir 81/602/EC

Dir 88/299/EC

Dir 88/146/EC



Dir 96/22/EC

Dir 2003/74/EC

Dir 2008/97/EC

# 1. DEFI INITIAL ET STRATEGIE

## 1.2 Stratégie « classique »

**Dir 96/23/EC**

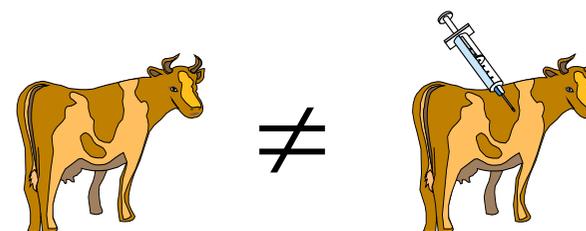
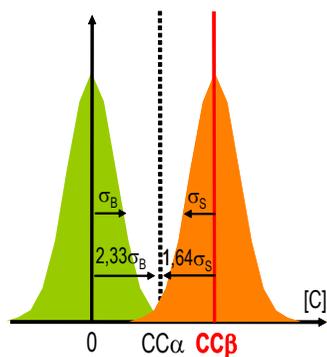
No L 125/10 EN Official Journal of the European Communities 23. 5. 96

COUNCIL DIRECTIVE 96/23/EC  
of 29 April 1996  
on measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products and repealing Directives 85/358/EEC and 86/469/EEC and Decisions 89/187/EEC and 91/664/EEC



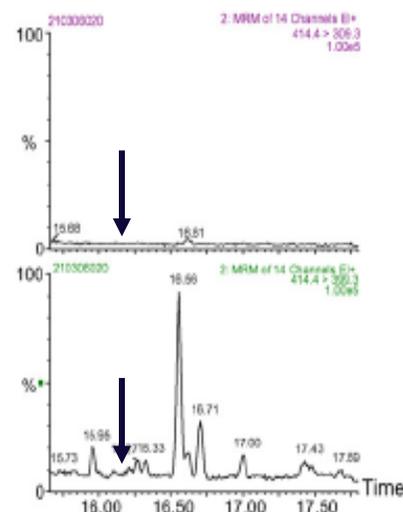
**Dec 2002/657/EC**

COMMISSION DECISION  
of 12 August 2002  
implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results  
(notified under document number C(2002) 3044)  
(Text with EEA relevance)  
(2002/657/EC)



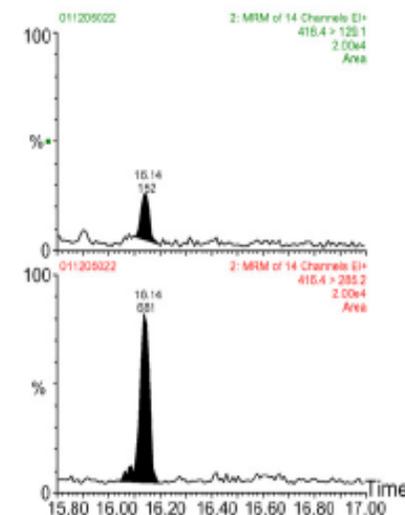
≠

RÉSIDU OU SES MÉTABOLITES



CONFORME

≠



SUSPECT

# 1. DEFI INITIAL ET STRATEGIE

## 1.3 Quels défis dans la traque aux anabolisants ?



### APPROCHE CLASSIQUE



MESURE CIBLEE

### NOUVELLE STRATEGIE



MESURE DE L'EFFET





I. DEFI INITIAL ET STRATEGIE

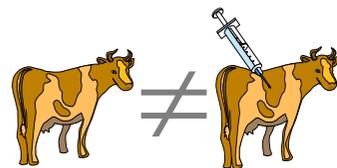
**II. MISE EN EVIDENCE & VALIDATION DE MARQUEURS D'EFFET**

III. ACCREDITATION - ACCEPTABILITE DE L'APPROCHE

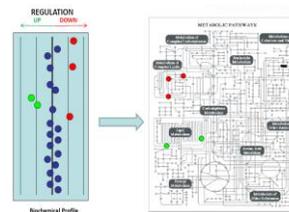
IV. MISE EN ŒUVRE & CONCLUSION

# 2. MISE EN EVIDENCE & VALIDATION DE BIOMARQUEURS D'EFFET

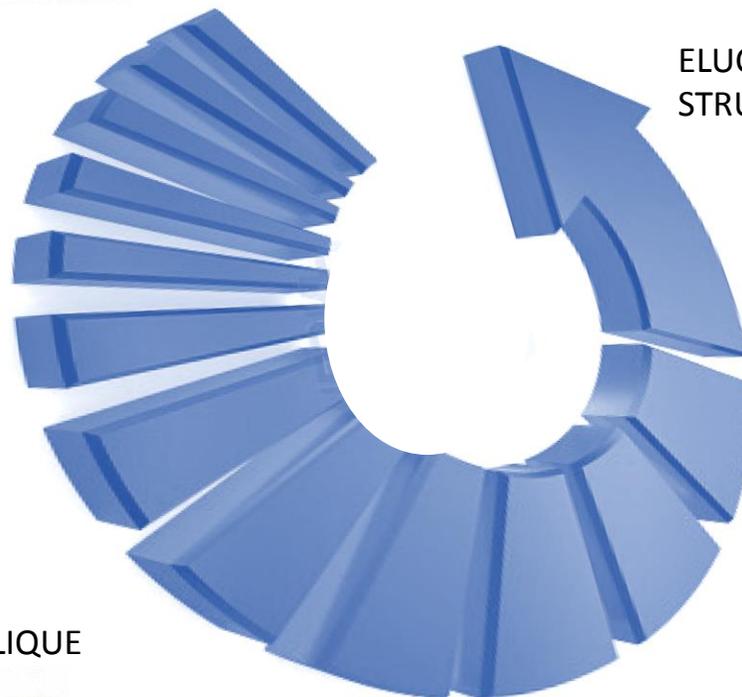
## 2.1 La métabolomique, une solution ?



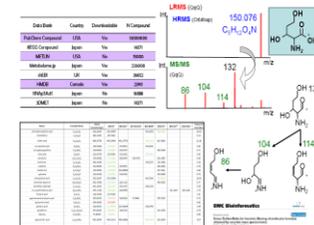
### CANDIDATS BIOMARQUEURS



### EXPERIMENTATION



### ELUCIDATION STRUCTURALE



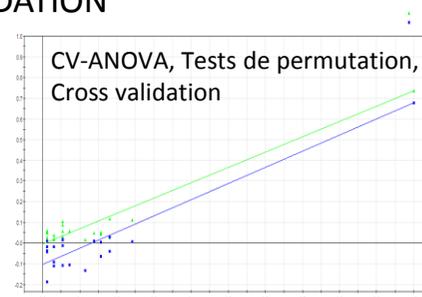
### PREPARATION D'ECHANTILLONS



+ EI, QC

### VALIDATION

CV-ANOVA, Tests de permutation, Cross validation

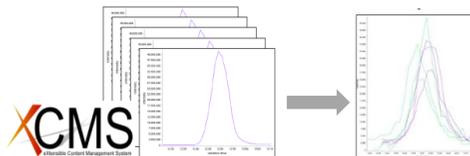


### PROFILAGE METABOLIQUE

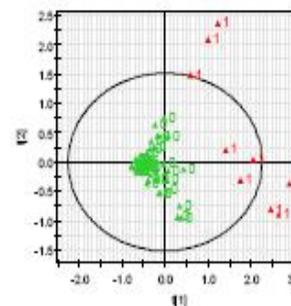


LC-ESI+HRMS

### RETRAITEMENT DES DONNEES



### ANALYSE DES DONNEES



ACP/ OPLS

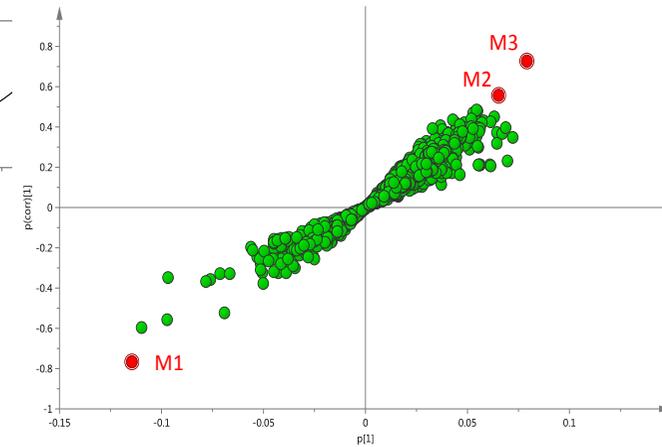
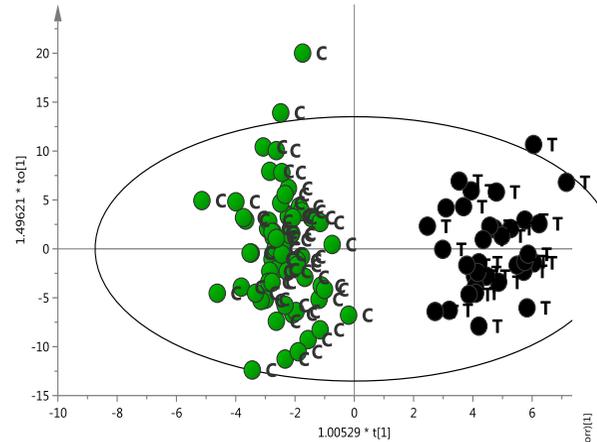
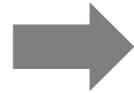
## 2. MISE EN EVIDENCE & VALIDATION DE BIOMARQUEURS D'EFFET

### 2.2 Modèle primitif

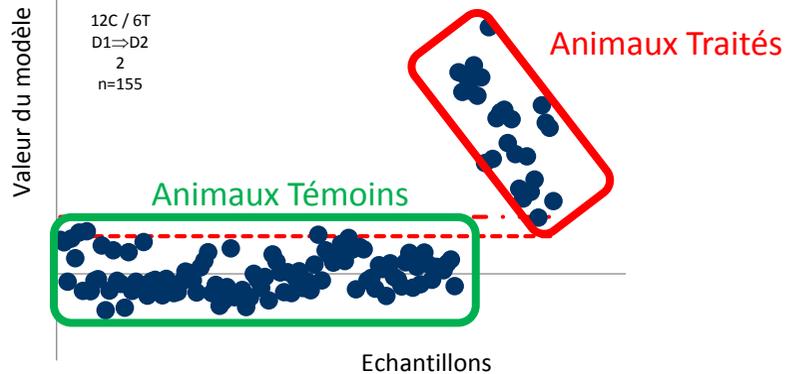
18 calves  
Holstein  
80 days old

Clenbuterol

21 days  
per os  
10 µg/kg bw



$$y = -0.91 \times [M1] + 0.44 \times [M2] + 0.37 \times [M3]$$



Ions	Identification	Masse (Da)	Tr (min)
M1	M132T51	132,0767	0,8
M2	M165T112	165,0657	1,9
M3	M280T404	280,1213	6,8

## 2. MISE EN EVIDENCE & VALIDATION DE BIOMARQUEURS D'EFFET

### 2.3 De l'expression des besoins à l'utilisation officielle... les défis à relever



## 2. MISE EN EVIDENCE & VALIDATION DE BIOMARQUEURS D'EFFET

### 2.4 Critères de robustesse

- SPECIFICITE**
  - “Challenge test”
  - Composés différents
  - Autres familles de facteurs de croissance
  - Substances vétérinaires autorisées

- SENSIBILITE**
  - Traitements basses doses
  - Fenêtre de détection
  - Performances analytiques

- ROBUSTESSE**
  - Reproductibilité (Int. / Ext.)
  - Test grande échelle

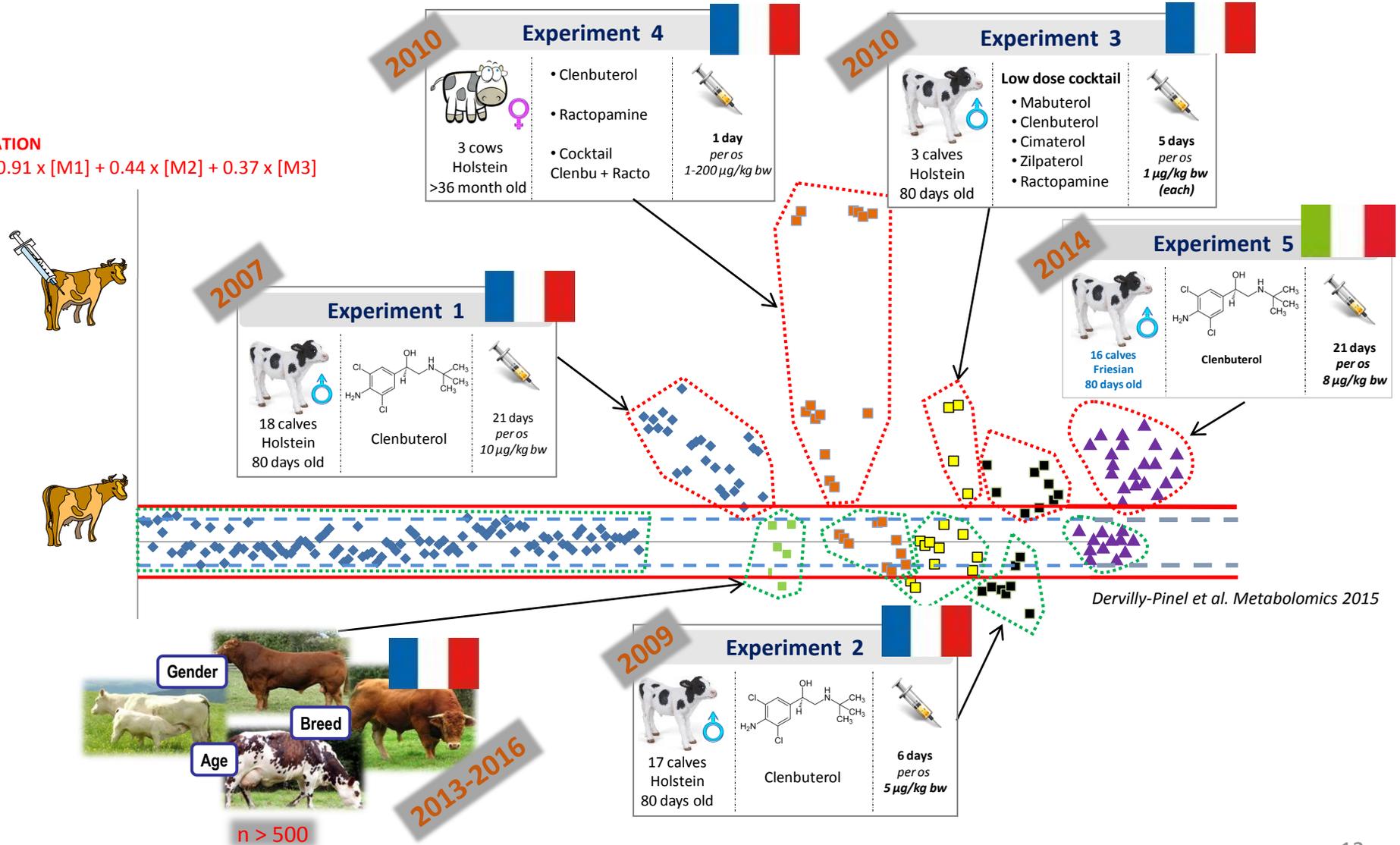
- PERFORMANCES**  
(FP/FN)



# 2. MISE EN EVIDENCE & VALIDATION DE BIOMARQUEURS D'EFFET

## 2.5 Validation du modèle

**EQUATION**  
 $y = -0.91 \times [M1] + 0.44 \times [M2] + 0.37 \times [M3]$

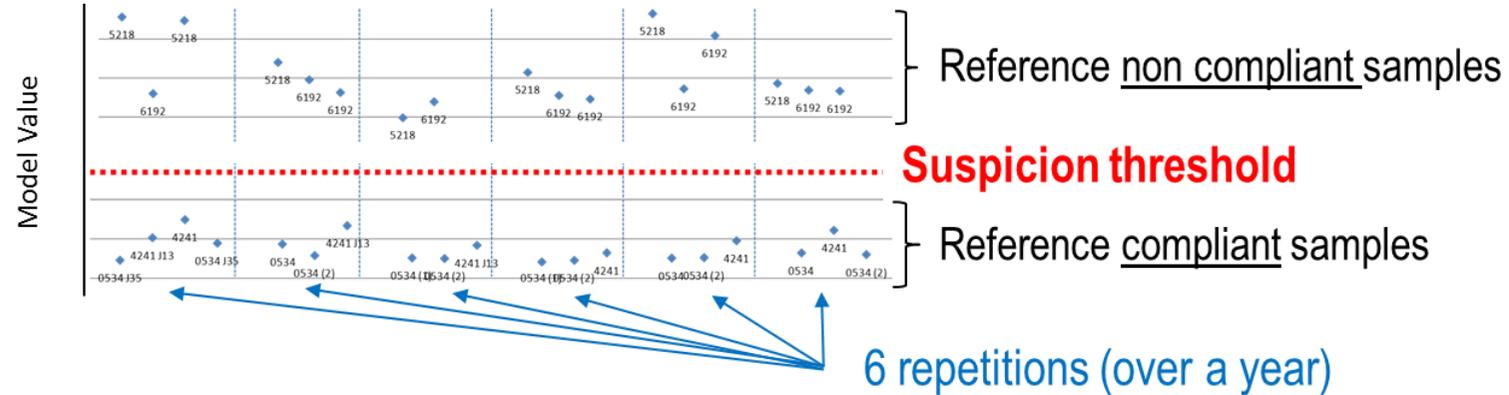


## 2. MISE EN EVIDENCE & VALIDATION DE BIOMARQUEURS D'EFFET

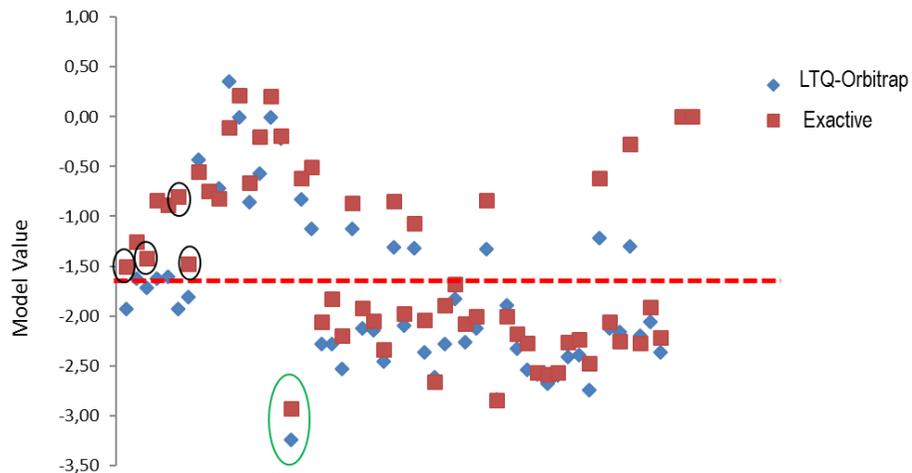
### 2.6 Robustesse analytique

#### ✓ STABILITE DES MARQUEURS    ✓ REPETABILITE & REPRODUCTIBILITE INTRA-LAB

- Storage duration
- Freezing/thawing cycles
- Temperature of storage

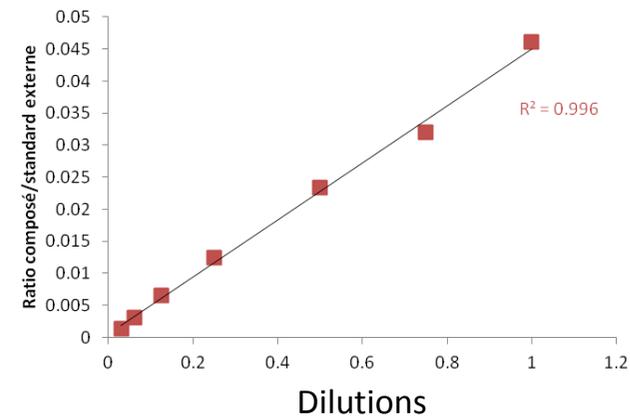


#### ✓ REPRODUCTIBILITE INSTRUMENTALE



Injection and prediction of same samples (n=50) on both instruments

#### ✓ MESURABILITE DU SIGNAL



## 2. MISE EN EVIDENCE & VALIDATION DE BIOMARQUEURS D'EFFET

### 2.7 Seuil de décision et performances

#### DÉCISION DE LA COMMISSION

(2002/657/EC)

#### 2.2. MÉTHODES DE DÉPISTAGE

Seules les techniques d'analyse dont on peut démontrer, sur la base de preuves identifiables, qu'elles sont validées et ont un taux de faux conformes inférieur à 5 % (erreur  $\beta$ ) au niveau considéré doivent être appliquées aux fins de dépistage conformément à la directive 96/23/CE. En cas de résultat non conforme suspect, ce résultat doit être confirmé par une méthode de confirmation.

Seuil fixé à  $2\sigma$

(veaux de moins de 6 mois, jusqu'à xx jours post-traitement)

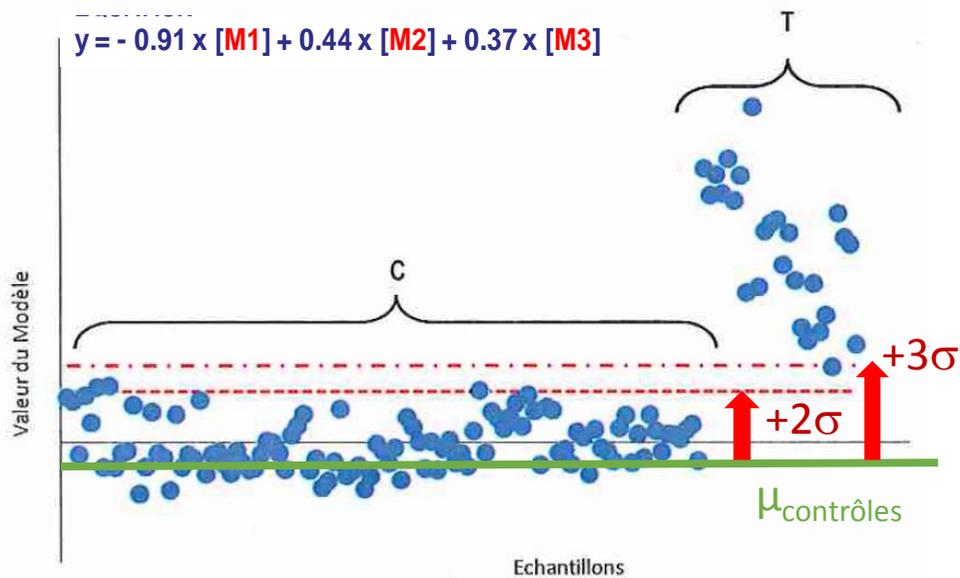


Tableau 3. Performances du modèle (seuil à +2 $\sigma$ )

Exp.	Nombres d'échantillons	FP	FN
A	213	2	3
B	89	6	0
C	10	0	3
D	6	0	2
E	128	8	0
PSPC veaux < 6mois	71	14	0
<b>Total</b>	<b>517</b>	<b>5,8%</b>	<b>1,1%</b>

✓ Stratégie mise en œuvre depuis 2013 au LABERCA



I. DEFI INITIAL ET STRATEGIE

II. MISE EN EVIDENCE & VALIDATION DE MARQUEURS D'EFFET

**III. ACCEPTABILITE DE L'APPROCHE & ACCREDITATION**

IV. MISE EN ŒUVRE & CONCLUSION

# 3. ACCEPTABILITE DE L'APPROCHE

## 3.1 Dissémination académique, acceptation par la communauté scientifique

2009

**Development of a metabolomic approach based on liquid chromatography-high resolution mass spectrometry to screen for clenbuterol abuse in calves**  
Frédérique Co and Bruno Le  
Trends in Analytical Chemistry, Vol. 29, No. 11, 2010  
www.rsc.org/analyst | Analyst

**Targeted and untargeted profiling of biological fluids to screen for anabolic steroids**  
G. Pinel, S. W...  
B. Le Bizec  
Metabolomics (2011) 7:84-93  
DOI 10.1007/s11306-010-0233-8

**Generation and fingerprints to require growth h...**  
Fanny Kieken · Gaud Pinel  
Patrice Garcia · Marie-Ag...  
Pierre Louis Toutain · Yv...

**Assessment of resolution m...  
anabolic ster...**  
Fanny Boyard-Kieken<sup>1,2</sup>  
Gaud Dervilly-Pinel<sup>2</sup>  
Patrice Garcia<sup>1</sup>  
Anne-Christelle Paris<sup>1</sup>  
Marie-Agnès Popot<sup>1</sup>  
Bruno Le Bizec<sup>2</sup>  
Yves Bonnair<sup>2</sup>  
Metabolomics (2014) 10:627-637  
DOI 10.1007/s11306-013-0604-z

**Comparison of different liquid chromatography stationary phases in LC-MS/MS**  
Research Article  
Analytica Chimica Acta  
journal homepage: www.elsevier.com/locate/aca

**Evaluation of specific gravity as normalization strategy for cattle urinary metabol...**  
ORIGINAL ARTICLE  
Metabolomics (2015) 11:184-197  
DOI 10.1007/s11306-014-0685-3

**Global urine fingerprint characterization practices in bovi...**  
ORIGINAL ARTICLE  
Metabolomics (2015) 11:1184-1196  
DOI 10.1007/s11306-015-0775-x

**First insights into serum metabolomics of trenbolone/estradiol implanted bovines; screening model to predict hormone-treated and control animals' status**  
Cristina C. Jacob · Gaud I...  
Giancarlo Bianco... · Br...

**Potential of mass spec...  
metabolomics for che...**  
ORIGINAL ARTICLE  
J. Judith Kouassi Nzoughet · G. Dervilly-P...  
S. Chéreau · G. Bianco... · F. Monteau ·  
C. T. Elliott · B. Le Bizec

→ PROTOCOLES ROBUSTES

→ CANDIDATS BIOMARQUEURS

→ PREMIERS MODELES

→ PREUVE DE CONCEPT

→ VALIDATION

→ DIFFERENTS PROMOTEURS

→ DIFFERENTES MATRICES

→ DIFFERENTES ESPECES

LC-HRMS based metabolomics screening model to detect various β-agonists treatments in bovines

**METABOLOMICS**  
Metabolomics (2017) 13:1-10  
DOI 10.1007/s11306-017-0775-x

Gaud Pinel, H. Gallart-Ayala, Sylvain Chéreau, Gaud Dervilly-Pinel

**Hydrophilic interaction (HILIC) and reverse phase liquid chromatography (RPLC)-high resolution MS for characterizing lipids profile disruption in serum of anabolic implanted bo...**  
J. Kouassi Nzoughet<sup>1</sup>, H. Gallart-Ayala<sup>1</sup>, G. Bianco...<sup>2</sup>, K. Hennig<sup>1</sup>,  
G. Dervilly-Pinel<sup>1</sup>, B. Le Bizec<sup>1</sup>

2017

### 3. ACCEPTABILITE DE L'APPROCHE

#### 3.2 Acceptation par les tutelles

2014

## EURL Reflection paper: Natural growth promoting substances in biological samples

Presence - and formation - of hormones and other growth promoting substances in food producing animals

Current approaches for enforcement and research needs for full implementation in residue control

#### EURL Recommendations

- Continue research on threshold value for specific biomarkers
- Continue the use of profiling techniques and data evaluation
- ...



2016



## Vers des stratégies analytiques globales et non ciblées de recherche de résidus de substances interdites en élevage

Gaud Dervilly-Pinel (laberca@oniris-nantes.fr), Stéphanie Prévost, Ludivine Sérée, Bruno Le Bizec  
Oniris, Laboratoire d'étude des résidus et contaminants dans les aliments (Laberca), Laboratoire national de référence pour les promoteurs de croissance et contaminants environnementaux organiques, LUNAM Université, Nantes, France

# 3. ACCEPTABILITE DE L'APPROCHE

## 3.3 Utilisation par l'autorité compétente

- Appui à la BNEVP (2013)



- Plan Expérimental Annuel DGAL depuis 2014

### 1.2.3. L'Appui Scientifique et Technique

#### 1.2.3.a. TUT-17-METABO-BETA : Plan expérimental

**Contexte et Objectifs :** Ce plan expérimental permet de mettre en œuvre par approche non ciblée le modèle proposé sur un échantillonnage d'urine de jeunes bovins et notamment âgés de moins de six mois, révélant un effet physiologique spécifiques des bêta agonistes. La méthode référencée LABERCA/A-u-OMIC s'applique à la détection dans l'urine de trois métabolites (créatine, M165 et M280) caractéristiques d'une administration illégale de  $\beta$ -agonistes. Des axes d'amélioration sont d'ores et déjà envisagés notamment concernant les conditions chromatographiques des trois composés d'intérêt. Les prélèvements seront collectés auprès des laboratoires du réseau promoteurs de croissance en ciblant les urines de veaux de moins de six mois.



## Annexe Technique DGAI Prévisionnel 2017

Le prévisionnel des activités du LABERCA au titre de l'année 2017 et en tant que Laboratoire National de Référence est présenté ci-après dans un document de 40 pages. Le budget prévisionnel de cette année a été établi sur les bases de ceux des deux années précédentes, mais est dorénavant articulé en trois grandes parties. Les substances surveillées sont traitées dans un premier chapitre incluant les substances anabolisantes, les contaminants de l'environnement et les substances particulières. Les substances émergentes avec leurs stratégies associées font l'objet d'un second chapitre qui précède une dernière partie consacrée aux autres activités du LABERCA telles la formation continue (SARAF), la contribution de

Nous vous souhaitons une bonne lecture de ce rapport d'activité et restons à votre disposition pour vous apporter si nécessaire des compléments d'information.

**Bruno LE BIZEC**  
20/02/2017

# 3. ACCEPTABILITE DE L'APPROCHE

## 3.4 En route vers l'accréditation ?

### DEVELOPPEMENT

RAPPORT FINAL de DEVELOPPEMENT  
REC-16-VALID-OMIC

<b>REDACTEUR</b>	Responsable Scientifique
Gaud DERVILLY-PINEL	
<b>VERIFICATEUR</b>	Responsable Qualité
Loïc HERPIN	
<b>VERIFICATEUR</b>	Membre plateforme métabolique
Anne-Lise ROYER	
<b>VERIFICATEUR</b>	Responsable UPC
Stéphanie PREVOST	
<b>APPROBATEUR</b>	Directeur
Bruno LE BIZEC	
<b>DESTINATAIRE</b>	Responsable Scientifique
Gaud DERVILLY-PINEL	

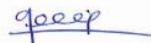
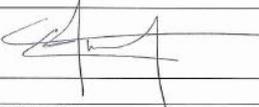
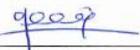
N° de diffusion 01

Référence du document	[REC-16-VALID-OMIC-1RF020]
Date d'édition	15 Septembre 2016

 **LABERCA**  
LABoratoire d'Etude des Résidus  
et Contaminants dans les Aliments  
BP 50707 - 44307 NANTES CEDEX  
Tél 02.40.68.78.80 - Fax 02.40.68.78.78

### VALIDATION

RAPPORT FINAL de VALIDATION  
REC-16-VALID-OMIC

<b>REDACTEUR</b>	
Gaud DERVILLY-PINEL	
<b>VERIFICATEUR</b>	
Loïc HERPIN	
<b>VERIFICATEUR</b>	
Anne-Lise ROYER	
<b>VERIFICATEUR</b>	
Stéphanie PREVOST	
<b>APPROBATEUR</b>	Directeur
Bruno LE BIZEC	
<b>DESTINATAIRE</b>	Responsable Scientifique
Gaud DERVILLY-PINEL	

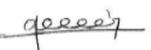
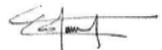
N° de diffusion 01

Référence du document	[REC-16-VALID-OMIC-2RF030]
Date d'édition	5 Décembre 2016

 **LABERCA**  
LABoratoire d'Etude des Résidus  
et Contaminants dans les Aliments  
BP 50707 - 44307 NANTES CEDEX  
Tél 02.40.68.78.80 - Fax 02.40.68.78.78

### MISE EN OEUVRE

DÉPISTAGE DE L'UTILISATION D'AGONISTES β-ADRÉNERGIQUES PAR  
CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE COUPLÉE A LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE HAUTE  
RESOLUTION

<b>REDACTEUR</b>	Membre Plate-forme Chimie Analytique
ROYER Anne-Lise	
<b>VERIFICATEUR</b>	Responsable Unité Promoteurs de Croissance
PREVOST Stéphanie	
<b>VERIFICATEUR</b>	Responsable Exploitation
MONTEAU Fabrice	
<b>VERIFICATEUR</b>	Responsable Qualité
HERPIN Loïc	
<b>VERIFICATEUR</b>	Responsable Scientifique Adjointe
DERVILLY PINEL Gaud	
<b>APPROBATEUR</b>	Directeur
LE BIZEC Bruno	

Référence de la méthode	LABERCA/A-u-OMIC.1.01
Date d'application	26/10/2016

 **LABERCA**  
LABoratoire d'Etude des Résidus  
et Contaminants dans les Aliments  
BP 50707 - 44307 NANTES CEDEX  
Tél 02.40.68.78.80 - Fax 02.40.68.78.78

# 3. ACCEPTABILITE DE L'APPROCHE

## 3.5 Accréditation



- Présentation de la méthode lors de l'audit COFRAC ISO17025

Avis favorable

8-9 déc 2016 ✓

- Commission technique d'évaluation

Refus d'extension d'accréditation pour le domaine LAB GTA 30

Février 2017 ✗

- Appel de la décision

Mars 2017

- Présentation devant le Groupe LAB GTA 30

« Les éléments complémentaires apportés par votre laboratoire ont été jugés recevables par l'ensemble des évaluateurs interrogés. L'identification structurale des métabolites M2 et M3 n'est donc pas nécessaire »

28 mars 2017 ✓

- Commission d'accréditation Biologie-Agroalimentaire

Avril 2017 ✓

- Demandes d'informations complémentaires à l'auditeur technique

9 mai 2017 ✓

- Notification COFRAC

13 juin 2017 ✓





I. DEFI INITIAL ET STRATEGIE

II. MISE EN EVIDENCE & VALIDATION DE MARQUEURS D'EFFET

III. ACCREDITATION - ACCEPTABILITE DE L'APPROCHE

**IV. MISE EN ŒUVRE & CONCLUSION**

# 4. MISE EN ŒUVRE & CONCLUSION

## 4.1 Mise en œuvre au sein du LNR et précautions d'usage de la méthode LC-HRMS

LABERCA/A-u-OMIC.1.01 B-agonistes/urine/LC-HRMS

**DÉPISTAGE DE L'UTILISATION D'AGONISTES  $\beta$ -ADRENERGIQUES PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE COUPLÉE A LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE HAUTE RESOLUTION**

<b>REDACTEUR</b>	Membre Plate-forme Chimie Analytique
ROYER Anne-Lise	
<b>VERIFICATEUR</b>	Responsable Unité Promoteurs de Croissance
PREVOST Stephanie	
<b>VERIFICATEUR</b>	Responsable Exploitation
MONTEAU Fabrice	
<b>VERIFICATEUR</b>	Responsable Qualité
HERPIN Loic	
<b>VERIFICATEUR</b>	Responsable Scientifique Adjointe
DERVILLY PINEL Gaud	
<b>APPROBATEUR</b>	Directeur
LE BIZEC Bruno	

Référence de la méthode	LABERCA/A-u-OMIC.1.01
Date d'application	26/10/2016



LABERCA  
LABoratoire d'Etude des Résidus  
et Contaminants dans les Aliments  
BP 50707 - 44307 NANTES CEDEX  
Tel 02.40.68.78.90 - Fax 02.40.68.78.78

La structure de la séquence d'injection se présente comme suit :

- 3 x Phase mobile (Eau (4.2.5) / ACN (4.2.3) (95:5 v/v)),
- 2 x Mix métabo,
- 6 x QC,
- Echantillon blanc,
- TC 0534-J35,
- TC 4241-J13,
- TNC 5218-J3,
- TNC 6192-J3,
- QC,
- 5 x Echantillons,
- QC,
- 5 x Echantillons,
- QC,
- ...,
- QC,
- TC 0534-J35,
- TC 4241-J13,
- TNC 5218-J3,
- TNC 6192-J3,
- Mix métabo,
- Phase mobile.

"QUALITY CONTROLS"

ETALONS INTERNES

TEMOINS CONFORMES

TEMOINS NON CONFORMES

- Filtration urine (10 kDa)
- LC-ESI+-HRMS workflow
- Intégration des pics (n=3)
- Prediction sur le modèle
- Edition du rapport d'essai (*conforme ou suspect*)

<b>Prélèvement 16.990.1</b>	Identification demandeur 105312591884
Nature : urine	
B-agonistes par LC-MS/MS	Echantillon conforme sur la base de la valeur seuil du modèle défini.
Méthode LABERCA/A-u-OMIC.1.01	



# 4. MISE EN ŒUVRE & CONCLUSION

## 4.2 Perspectives

- ELUCIDATION

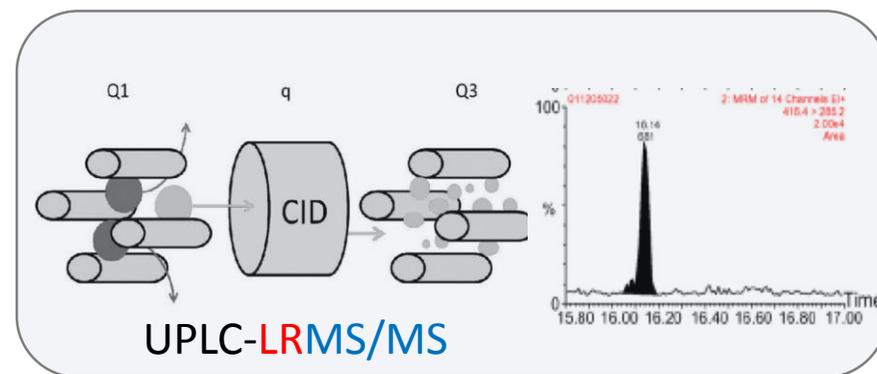
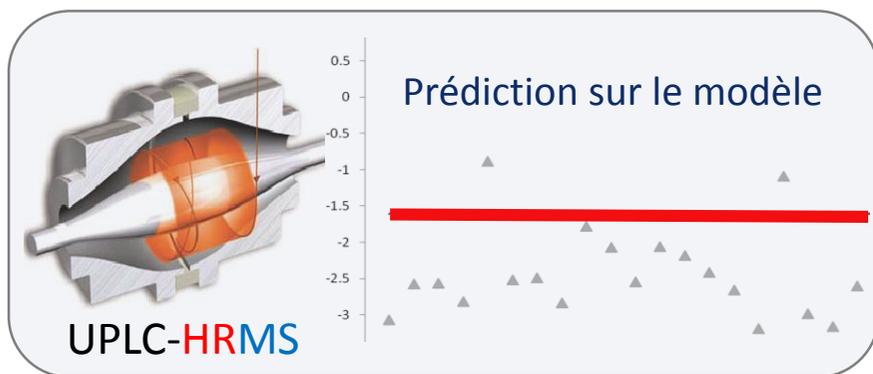


Fractionnement  
Concentration



Analyse RMN 700 MHz

- TRANSFERT MÉTHODOLOGIQUE



Full Scan HRMS

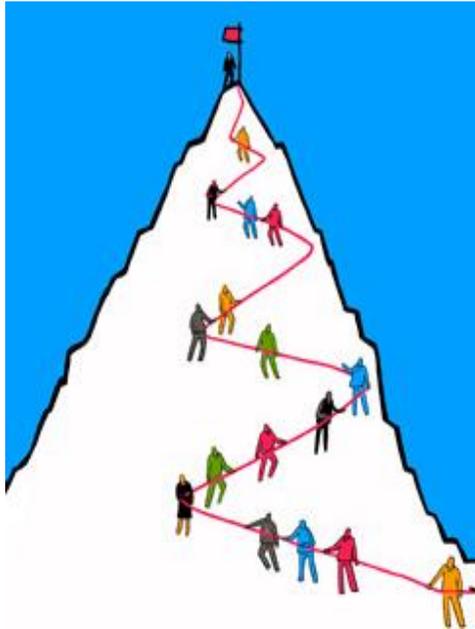


Fragmentation MS<sup>2</sup>



SRM Transitions

# REMERCIEMENTS

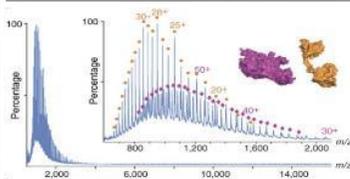


Merci de votre  
attention

# Développement, Validation et Accréditation de stratégies non-ciblées.

Application à la gestion du risque chimique dans les aliments

Ministère de l'Agriculture, 6 février 2018



**Gaud DERVILLY, Dr, HDR**

Anne-Lise ROYER,  
 Fabrice MONTEAU,  
 Stéphanie PREVOST,  
 Bruno LE BIZEC

Laboratoire d'Étude des Résidus et Contaminants dans les Aliments (LABERCA)  
 INRA 1329, Oniris, Université Bretagne-Loire  
 BP 50707, 44307 Nantes Cedex 3, France - [www.laberca.org](http://www.laberca.org)

