

## Résidus et contaminants des denrées alimentaires : 25 ans de progrès dans leur analyse

### IV. DIOXINES ET AUTRES CONTAMINANTS : MÉTHODES BASÉES SUR LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE

DE PAUW E.<sup>1</sup>, MAGHUIN-ROGISTER G.<sup>2</sup>

1. Laboratoire de spectrométrie de masse (LSM), Centre d'analyse des résidus en traces (CART), Faculté des Sciences, Université de Liège, Allée de la Chimie, bât.B6, 4000 Liège
2. Laboratoire d'Analyse des Denrées alimentaires (LADA), Centre d'Analyse des Résidus en Traces (CART), Département des Sciences des Denrées alimentaires, Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège, Boulevard de Colonster, 20 - bât. B43b, 4000 Liège

Texte d'une conférence donnée le 11 mai 2005 dans le cadre de la célébration des 25 ans d'existence du Laboratoire d'Analyse des Denrées alimentaires, de l'Université de Liège. Les diapositives des exposés sont disponibles sur le site de la section Wallonie-Bruxelles de la WAVFH (World Association of Veterinary Food Hygienists) : <http://www.wavfh.ulg.ac.be/>

Correspondance : Prof. G. MAGHUIN-ROGISTER - [g.maghuin@ulg.ac.be](mailto:g.maghuin@ulg.ac.be)

**RESUME :** La spectrométrie de masse à haute résolution a d'abord été appliquée, à l'Université de Liège, à la détermination des hormones anabolisantes. Cette technique, couplée à la chromatographie en phase gazeuse, a ensuite été utilisée, après « la crise belge de la dioxine » en 1999, pour la mesure de la contamination des denrées alimentaires en dioxines et furannes, puis ensuite pour les polychlorobiphényles (PCB) de type dioxine.

Une nouvelle approche développée dans le cadre du programme de recherche européen BIOCOP serait d'utiliser les méthodes physicochimiques pour quantifier les effets biologiques. En recherchant des biomarqueurs d'effets, la toxicogénomique et la toxicoprotéomique compléteront les méthodes physicochimiques traditionnelles.

### INTRODUCTION

En analyse des résidus et des contaminants dans les denrées alimentaires, les méthodes d'analyse physicochimique, les tests biologiques et biochimiques ainsi que les techniques de protéomique seront de plus en plus souvent associées afin d'optimiser le contrôle.

Les premières déterminations de résidus par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse ont été réalisées à l'Université de Liège à la fin des années '80 pour les hormones anabolisantes. À l'époque pour atteindre des limites de détection des résidus de l'ordre du ppb, il fallait

recourir à la spectrométrie de masse à haute résolution (Van Vyncht *et al.*, 1994 ; 1996).

### PROBLÉMATIQUE DE L'ANALYSE DES DIOXINES ET DES COMPOSÉS APPARENTÉS DANS LES ALIMENTS

Au début des années '90, il y avait aussi un problème de dioxines, moins médiatisé que celui des hormones : il concernait d'avantage l'environnement. Suite à l'accident de Seveso en 1976, des inquiétudes étaient apparues à propos des PCBs (polychlorobiphényles), de l'incinération des déchets et de la

sidérurgie, trois sources identifiées de dioxines.

En 1999, l'expérience du laboratoire de spectrométrie de masse de l'Université de Liège en matière d'analyse quantitative de dioxines dans des échantillons environnementaux a pu être mise à profit dans le cadre de la « crise belge de la dioxine ». Cette crise a entraîné, fin 1999, la création du CART (Centre d'Analyse des Résidus en Traces) par le Conseil d'Administration de l'Université. Ce centre est composé de quatre laboratoires de l'Université de Liège : le laboratoire d'analyse des denrées alimentaires (LADA), le laboratoire d'écologie animale et

d'écotoxicologie (LEAE), le laboratoire de biologie moléculaire et de génie génétique (LBMGG) et le laboratoire de spectrométrie de masse (LSM). Grâce à des subsides du Ministère de la Région wallonne et de l'Union européenne (FEDER), suffisants en période de crise, le CART a pu acquérir l'équipement indispensable à des analyses en routine de dioxines et des composés apparentés dans les denrées alimentaires et dans les aliments pour bétail. Cette « crise de la dioxine » a causé des pertes économiques considérables dans le secteur des viandes et abats consommables (figure 1). L'équipe liégeoise de scientifiques et de techniciens a pu être stabilisée et renforcée grâce à des crédits régionaux et européens (FSE : Fonds social européen) et le CART a atteint ainsi son objectif de mise au point du dosage des dioxines dans des matrices biologiques à des niveaux de concentration extrêmement faibles (de l'ordre du ppt) au service des entreprises de la région

wallonne et des pouvoirs publics. Rapidement, les PCB coplanaires doués d'activité dioxine ont été inclus dans la liste des substances dosées et la capacité d'analyse du CART en terme de nombre d'échantillons et de délai de remise de résultat s'est considérablement améliorée. Des méthodes automatisées et fiables d'extraction (par solvant pressurisé) (Focant *et al.*, 2004) et de purification automatisée (sur cartouches jetables POWERPREP) (Focant and De Pauw, 2002) ainsi qu'une méthode sûre, combinant identification et quantification, la chromatographie gazeuse à haute résolution couplée à la spectrométrie de masse à haute résolution (HRGC-HRMS) (Focant *et al.*, 2001) ont été mises au point. Ces efforts ont abouti à la capacité de doser simultanément 30 composés parmi les 419 congénères de dioxines et substances apparentées, mais de niveau de toxicité différant de plusieurs ordres de grandeur. La contamination environnementale étant parfois importante, la

mesure de la contamination de denrées alimentaires est souvent proche du bruit de fond. La technique d'analyse doit donc permettre de détecter des fluctuations faibles de concentration, proche du seuil de quantification, avec l'obligation de résultats fiables afin de ne pas pénaliser d'avantage un secteur de production déjà fragilisé.

La dilution isotopique permet, en spectrométrie de masse :

- l'évaluation du rendement d'extraction pour chaque échantillon grâce à l'ajout d'une substance de référence à l'échantillon avant l'extraction ;
- l'analyse quantitative grâce à des ajouts dosés d'étalons internes afin d'établir les courbes de calibration. Ces étalons internes sont des substances identiques à celles qu'on doit mesurer, si ce n'est qu'elles sont marquées grâce à un isotope stable du carbone (carbone 13). Ces deux types de composés (naturels riches en carbone 12 et marqués au carbone 13) possèdent les mêmes propriétés physicochimiques et donc le même comportement lors des étapes d'extraction et de purification et lors de l'analyse chromatographique. Néanmoins, la spectrométrie de masse permet de les distinguer grâce à leur masse différente.

Le problème avec les dioxines est que des composés de masse identique ont des toxicités très différentes. Toute interférence dans l'estimation de la concentration d'un composé risque donc d'avoir un impact important dans la détermination de la quantité équivalente toxique de l'échantillon (Maghuin-Rogister *et al.*, 1999). Pour arriver à l'évaluation complète de la toxicité d'un échantillon, il faudra à l'avenir inclure dans la liste des substances analysées aux côtés des dioxines, les furannes et les PCB coplanaires (figure 2), les dioxines bromées ou fluorées, les furannes bromés ou fluorés...

Ces analyses doivent évidemment être effectuées sous système qualité. Le domaine de concentrations de ces composés dans les denrées alimentaires étant très faible, les incertitudes

Figure 1. Statistiques des exportations de viandes et abats comestibles (source Belgostat)

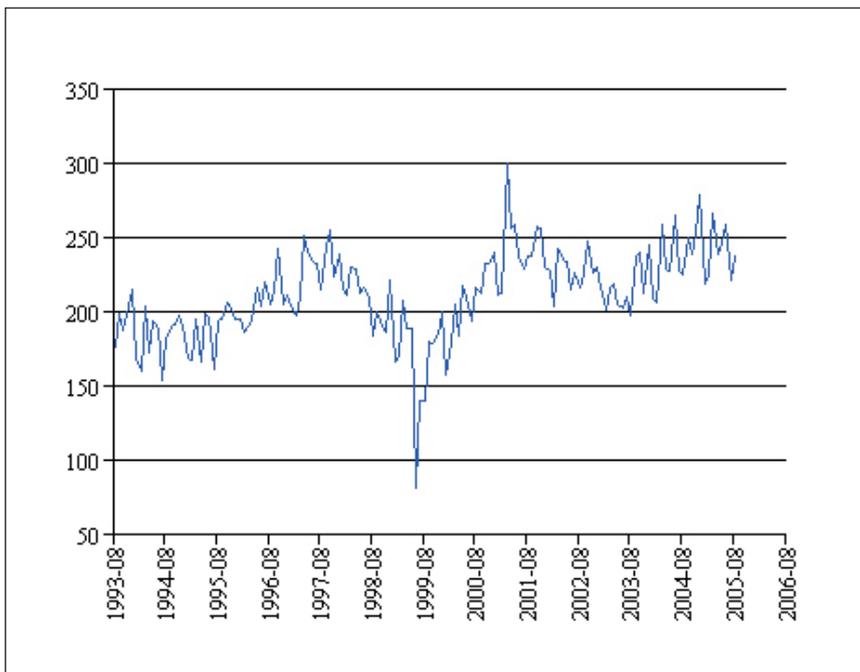
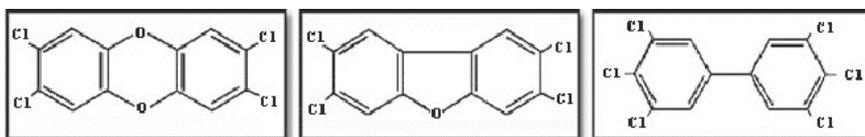


Figure 2. Formules des dioxines, furannes et polychlorobiphényles



de mesures doivent être réduites au minimum, en partie grâce à un système qualité performant, afin de pouvoir interpréter les résultats par rapport aux normes (Epepe *et al.*, 2004a ; 2004b).

### MÉTHODES ALTERNATIVES D'ANALYSE DES DIOXINES

À côté des tests biologiques sur cellules de type CALUX, des méthodes alternatives multidimensionnelles voient le jour.

Elles incluent :

- la spectrométrie de masse multiple (*MS<sup>n</sup>*) ;
- la spectrométrie de masse en temps de vol (*TOF : Time of Flight*), c'est la seule technique de spectrométrie de masse à balayage rapide, ce qui permet aussi d'envisager de pratiquer la chromatographie rapide pour certains types de résidus ;
- le couplage des techniques de séparation (*GC\*GC, LC-GC*) autorise une augmentation considérable de la résolution chromatographique. Si on admet qu'on peut séparer par exemple 100 composés dans une première dimension chromatographique et si on peut séparer dans une deuxième dimension, basée sur une propriété différente de celle qui a permis la première séparation, les pics où plusieurs substances seraient co-élucées, ce couplage permettrait la séparation de 100 x 10, soit mille substances. Ces techniques multidimensionnelles augmentent donc considérablement la capacité de résolution du système. Bien entendu les logiciels de pilotage et le traitement des données sont complexes ;
- l'intégration des processus d'extraction, de *clean-up* et de mesure ;
- l'intégration bioessais – méthodes physicochimiques ;
- l'extension de la gamme des composés en concertation avec d'autres centres de recherche tels que ceux de la Faculté des sciences agronomiques de Gembloux, du Centre d'Economie rurale (CER) à Marloie.

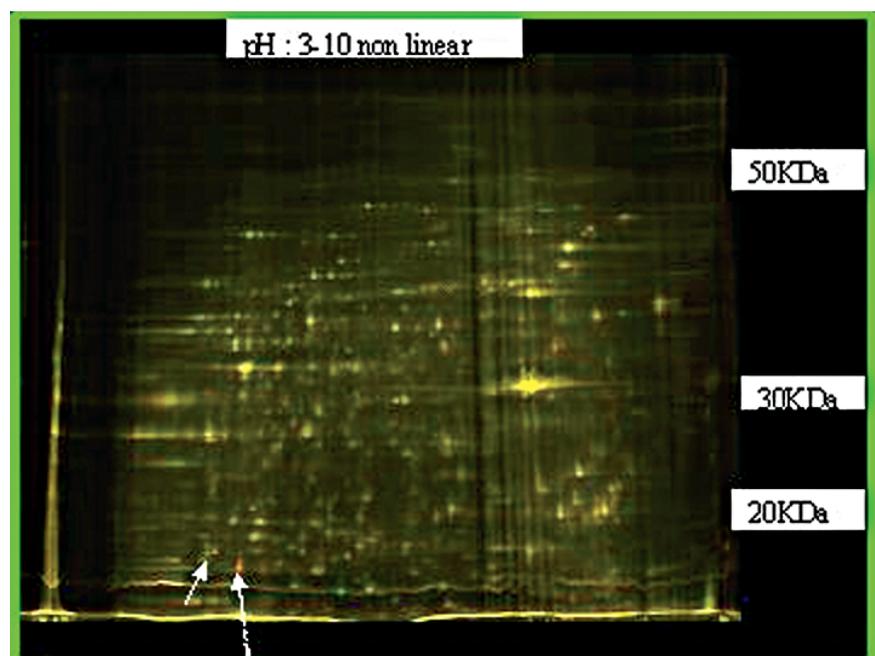
### EVOLUTION DES MÉTHODES DE CONTRÔLE GRÂCE À L'INTÉGRATION DE TECHNIQUES DE LA PHYSICOCHIMIE ET DE LA BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

Le programme européen BIOCOP a débuté récemment (<http://www.biocop.org>). Ce programme a l'ambition de changer complètement la vision de la chimie analytique. On ne va plus se contenter de pratiquer des bioessais pour le dépistage et des méthodes physicochimiques pour l'identification et la quantification, mais on se propose de faire de la chimie analytique d'essais. Autrement dit, le but est de prendre le meilleur des deux mondes en utilisant les méthodes physicochimiques pour quantifier les effets biologiques. La recherche de biomarqueurs d'effets, la toxicogénomique et la toxicoprotéomique vont venir compléter les méthodes physicochimiques traditionnelles. On tentera par exemple d'identifier, dans le sang d'un animal suspect d'avoir été traité au moyen de substances interdites, des marqueurs de traitement même si les résidus de ces traitements ont disparu. Un des moyens d'atteindre ce but est de travailler sur la protéomique d'ex-

pression en identifiant un maximum de protéines sanguines par exemple grâce à des techniques d'électrophorèse sur gel à deux dimensions en comparant des animaux traités et non traités par une substance donnée (figure 3). Grâce à l'analyse d'images et en utilisant éventuellement des marqueurs fluorescents, les profils protéiques seront comparés sans *a priori* quant à la nature des protéines afin d'identifier des différences au niveau des taches sur le gel et donc indirectement les gènes dont l'expression est modifiée par le traitement. En appliquant la technique de dilution isotopique, on a accès à la protéomique quantitative. On peut donc doser une protéine donnée en la fractionnant en peptides, les peptides obtenus étant ensuite mélangés à des peptides marqués par des isotopes stables (carbone 13, deutérium) ou encore en marquant des peptides au moyen d'étiquettes permettant par la suite de purifier les peptides marqués par chromatographie d'affinité.

Pour la purification, des techniques nouvelles basées sur les aptamères constitués d'oligonucléotides sélectionnés pour leur grande affinité, viendront compléter les méthodes tra-

Figure 3. Analyse par électrophorèse sur gel à 2 dimensions en fluorescence (2D-DIGE) de fractions cytoplasmiques de cellules humaines PBMC traitées ou non avec des dioxines (en vert : protéines des cellules non traitées ; en rouge : protéines des cellules traitées ; les taches en jaune correspondent à des protéines exprimées dans les deux types de cellules). Les masses moléculaires des protéines sont données sur l'échelle de droite



ditionnelles basées sur des anticorps (chromatographie d'immunoaffinité) (Berensy *et al.*, 2001).

Enfin, une autre possibilité d'application des aptamères, capables de reconnaissance moléculaire, est de les inclure dans un transducteur de signal système biosenseur proposé dans le projet européen FAME (*Functionalized Advanced Materials and Engineering of Hybrids and Ceramics* - <http://www.famenoe.org>) qui concerne les matériaux intelligents et la nanotechnologie.

#### REMERCIEMENTS

Les membres du CART remercient les différentes instances qui ont participé à son financement, l'Université de Liège, la DGTRE, le FNRS, l'Union

Européenne ainsi que les agences qui lui ont confié des missions d'expertise (AFSCA, l'Institut de veille sanitaire français, les associations locales).

#### SUMMARY

#### RESIDUES AND CONTAMINANTS IN FOOD: 25 YEARS OF PROGRESS IN THEIR ANALYSIS.

#### IV. Dioxins and other contaminants. Methods based on mass spectrometry.

High resolution mass spectrometry was first applied, at the University of Liège, for determining anabolizing hormones.

This technique, coupled to gas chromatography, was then used, after the "Belgian dioxine crisis" in 1999, to measure food contamination by dioxins and furans, soon followed by dioxin-like PCBs.

A new approach, developed in the European research project BIOCOP would be the use of physicochemical methods for quantifying biological effects. By searching for effect biomarkers, toxicogenomic and toxicoproteomic will reinforce traditional physicochemical methods.

#### BIBLIOGRAPHIE

- BERENSY C., THAINY A., SCHROEDER R. A Tetracycline-binding RNA Aptamer. *Bioorganic Med. Chem.*, 2001, **9**, 2549-2556.
- EPPE G., FOCANT J. F., PIRARD C., DE PAUW E. PTV-LV-GC/MS/MS as screening and complementary method to HRMS for the monitoring of dioxin levels in food and feed. *Talanta*, 2004, **63**, 1135-1146.
- EPPE G., COFINO W.P., DE PAUW E. Performances and limitations of the HRMS method for dioxins, furans and dioxin-like PCBs analysis in animal feedingstuffs. Part I: results of an inter-laboratory study. *Anal. Chim. Acta*, 2004, **519**, 231-242.
- FOCANT J.F., EPPE G., DE PAUW E. Optimisation and use of tandem-in-time mass spectrometry in comparison with immunoassay and HRGC/HRMS for PCDD/F screening. *Chemosphere*, 2001, **43**, 417-424.
- FOCANT J.F., PIRARD C., DEPAUW E. Automated sample preparation-fractionation for the measurement of dioxins and related compounds in biological matrices: a review. *Talanta*, 2004, **63**, 1101-1113.
- FOCANT J.F., DE PAUW E. Fast automated extraction and clean-up of biological fluids for polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans and coplanar polychlorinated biphenyls analysis. *J. Chromatogr. B*, 2002, **776**, 199-212.
- MAGHUIN-ROGISTER G., DELAUNOIS A., DE PAUW E., GUSTIN P. La pollution de la chaîne alimentaire par la dioxine. *Ann. Méd. Vét.*, 1999, **143**, 379-392.
- VAN VYNCHT G., GASPAR P., DE PAUW E., MAGHUIN-ROGISTER G. Multi-Residue screening and confirmatory analysis of anabolic-steroids in urine by gas-chromatography coupled with tandem mass-spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1994, **683**, 67-74.
- VAN VYNCHT G., PREECE S., GASPAR P., MAGHUIN-ROGISTER G., DEPAUW E. Gas and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry for the multiresidue analysis of beta-agonists in biological matrices. *J. Chromatogr. A*, 1996, **750**, 43-50.