

---

# La surveillance des résidus de colorants dans les denrées alimentaires

## 2.1 La réglementation internationale et européenne sur les traitements par des colorants dans les élevages aquacoles

La **LMR** (Limite Maximale de Résidus) d'une substance active tel qu'un médicament vétérinaire, correspond à la teneur maximale de cette substance (et dans certains cas, de ses métabolites) légalement autorisée dans les denrées alimentaires d'origine animale, comme le poisson. Ces valeurs diffèrent, pour une même substance active, selon l'espèce animale, le tissu ou le produit concerné (viande, graisse et peau, foie, rein, lait, œufs, miel). Dans le cas du poisson, elle s'applique au muscle et à la peau associée dans des proportions naturelles. Les LMR sont basées sur les **DJA** (Doses Journalières Admissibles) après évaluation des risques liés à l'alimentation chez l'homme. La DJA est généralement estimée en divisant la NOEL (no-observed-effect level ou Dose Sans Effet Observable) de la substance par un facteur de sécurité. Au niveau international, ces valeurs sont émises par l'OMS et la FAO et référencées dans la base de données du Codex Alimentarius (FAO-WHO, 2020), afin d'énoncer des principes d'efforts et de surveillance en matière de sécurité sanitaire des aliments. Bien que des recommandations soient émises pour harmoniser les limites maximales de résidus dans le monde entier, les LMR varient toujours d'un lieu géographique à un autre. En fait, les LMR dans un produit animal particulier peuvent différer d'un pays à l'autre en fonction des organismes de réglementation locaux en matière de sécurité des aliments et des schémas d'utilisation des médicaments, et la plupart des pays en développement doivent encore élaborer leurs propres LMR (Okocha et al., 2018). En Europe, les LMR sont établies conformément aux Règlements (CE) N°470/2009 et N°37/2010 décrivant l'utilisation avisée des substances pharmacologiquement actives et définissant les LMR de substances autorisées, à des niveaux de tolérance dans les aliments d'origine animale (Commission Européenne, 2009, 2010). Les médicaments vétérinaires autorisés sont listés dans le tableau 1 du Règlement (CE) N°37/2010 (Commission Européenne, 2010).

Dans les pays avancés, l'utilisation des médicaments en aquaculture est hautement contrôlée. Il existe à l'heure actuelle peu de substances à usage vétérinaire autorisées dans le monde pour une utilisation en aquaculture. En effet, les études d'évaluation de risque sont coûteuses et complexes à établir chez le poisson pour les déposants de demandes d'autorisation. Néanmoins,

des LMR ont été établies en Union Européenne pour le poisson d'élevage avec par exemple une LMR à 100 µg/kg pour l'enrofloxacin et son métabolite la ciprofloxacine, à 50 µg/kg pour le triméthoprim, à 1 000 µg/kg pour le florfenicol et son métabolite le florfenicol amine, à 100 µg/kg pour les sulfamides et pour les tétracyclines (Lulijwa et al., 2019). Le Règlement (CE) N°37/2010 identifie également neuf substances pharmacologiquement actives interdites et répertoriées dans son tableau 2 (chloramphénicol, chloroforme, chlorpromazine, colchicine, dapson, diméridazole, métronidazole, ronidazole et les nitrofuranes, dont la furazolidone), pour lesquelles aucune LMR ne peut être établie en raison des résidus de ces substances qui, à quelque limite que ce soit, constitue un danger pour la santé humaine (Justino et al., 2016).

En ce sens, les colorants ne sont pas inclus dans le tableau 2 des substances vétérinaires interdites car ils n'ont pas été soumis à évaluation par l'Agence Européenne du Médicament et n'ont donc jamais été considérés comme des substances médicamenteuses. Ils tombent alors sous le coup d'une substance chimique contaminant de l'environnement et doivent être évalués par l'EFSA. Par ailleurs, il faut noter qu'aucun colorant ne s'est vu attribué une LMR en Europe comme au niveau international. Lorsque l'évaluation des risques, comme pour MG et LMG, ne permet pas d'attribuer une DJA, la substance est considérée comme non saine à n'importe quelle concentration pour l'homme et par conséquent se trouve interdite d'utilisation en production animale. Pour MG/LMG, l'EFSA a conclu qu'aucune DJA ne pouvait être établie à cause du manque de données concernant l'estimation de l'exposition chez l'homme par la voie alimentaire (EFSA, 2016). C'est pourquoi elles ont été interdites chez les animaux aquatiques destinés à l'alimentation dans l'Union Européenne mais aussi par le gouvernement Canadien (Santé-Canada) et par la FDA aux États-Unis. Ainsi, l'utilisation commerciale du MG n'est pas autorisée dans l'UE depuis 2002 (Hall et al., 2008; López-Gutiérrez et al., 2013). Par conséquent, la « **tolérance zéro** » doit s'appliquer pour les médicaments et substances vétérinaires interdits dans les produits d'aquaculture, le « zéro » représentant une limite de détection de l'instrument analytique utilisé pour le contrôle officiel.

En Europe, une limite de performance minimale requise (**LPMR**), c'est-à-dire la quantité minimale d'un analyte dans un échantillon à détecter et à confirmer, a été établie afin d'harmoniser les performances analytiques des méthodes pour les substances pour lesquelles aucune limite autorisée n'a été établie » (Commission Européenne, 2002a). La LPMR a été fixée à 2 µg/kg pour la détermination des résidus du MG dans les produits d'aquaculture pour la somme de MG et de LMG (Commission Européenne, 2004) (**Figure 17**). De plus, la FDA

aux USA établit une sensibilité minimale de 1 µg/kg pour les contrôles réglementaires (Chen and Miao, 2010).

Afin d'établir une approche harmonisée pour le contrôle des résidus de substances non autorisées dans les denrées alimentaires d'origine animale importées dans l'UE, la Commission Européenne a adopté la Décision 2005/34/CE (Commission Européenne, 2005). Cette décision établit les **RPA (Reference Point for Action)** pour les résidus de substances pour lesquelles les valeurs de LPMR ont été établies conformément à la Décision 2002/657/CE (Commission Européenne, 2002a). Les RPA sont particulièrement nécessaires lorsque des tests analytiques sur les lots importés de produits d'origine animale confirment la présence de tels résidus et pour engager les mesures sanitaires à prendre après cette confirmation. À la suite de cette décision 2005/34/CE, les LPMR axées sur l'analyse et dérivées à l'origine pour l'harmonisation des méthodes d'analyse ont été assimilées aux RPA permettant ainsi de vérifier analytiquement la conformité des produits importés de pays tiers avec la législation de l'UE. Ainsi, l'approche de la LPMR dans le cas de la tolérance zéro était à l'origine, seulement basée sur une limite analytique. L'EFSA a souhaité ensuite compléter ce dispositif en introduisant une valeur réglementaire RPA basée à la fois sur une limite analytique et sur une estimation du risque basée sur la toxicité des substances interdites (EFSA, 2013a). Le chloramphénicol, les nitrofuranes et MG ont été évalués spécifiquement afin d'établir des RPA et font l'objet de rapports scientifiques détaillés de l'EFSA. Pour MG, le panel d'experts de l'EFSA « Contam Panel » a conclu qu'il était peu probable qu'une exposition à MG/LMG via l'alimentation à des concentrations inférieures ou égales à une RPA de 2 µg/kg pouvait représenter un risque de santé (EFSA, 2016). De ce fait, cette RPA a été adoptée en 2016.

Cependant, en 2018, l'EFSA a révisé son approche d'estimation des RPA. L'approche progressive proposée prend en compte des facteurs tels que la capacité analytique, le potentiel toxique et l'activité pharmacologique de la substance en question. Le concept de **TSV ou « Toxicological Screening Value »**, est introduit afin de le comparer à la plus faible limite de décision analytique  $CC\alpha$  (voir chapitre 2.3 pour l'explication du  $CC\alpha$ ) (Knutsen et al., 2018). Les substances actives pharmacologiquement sont alors classées dans des groupes selon leur toxicité avérée ou le manque d'information au regard de celle-ci. L'exemple du MG montre que l'exposition alimentaire est estimée selon l'outil « FACE » de calcul de l'EFSA à 0,033 µg/kg pour une RPA à 2 µg/kg et se trouve donc être bien supérieure à la TSV de 0,0025 µg/kg pour le groupe I. Ceci indique qu'il est nécessaire d'améliorer la sensibilité de la méthode analytique ou de réaliser une évaluation des risques spécifique à la substance MG/LMG.

Compte tenu des incertitudes identifiées par l'EFSA, il a été alors recommandé d'améliorer la sensibilité des méthodes analytiques afin de permettre l'application des concentrations les plus faibles possibles. Dans ce cadre, une nouvelle RPA a été proposée à 0.5 µg/kg pour MG/LMG et actée dans le règlement (UE) 2019/1871 (Commission Européenne, 2019). Pour les autres colorants, une TSV vient d'être proposée par l'EFSA comme expliquée au chapitre 1.2.3.2 du document EFSA traitant de la classification des colorants selon leur toxicité. Pour ceux-ci, il est possible qu'une RPA réglementaire leur soit attribuée au niveau européen découlant de cette classification et selon le degré d'exposition de la population à ces substances.

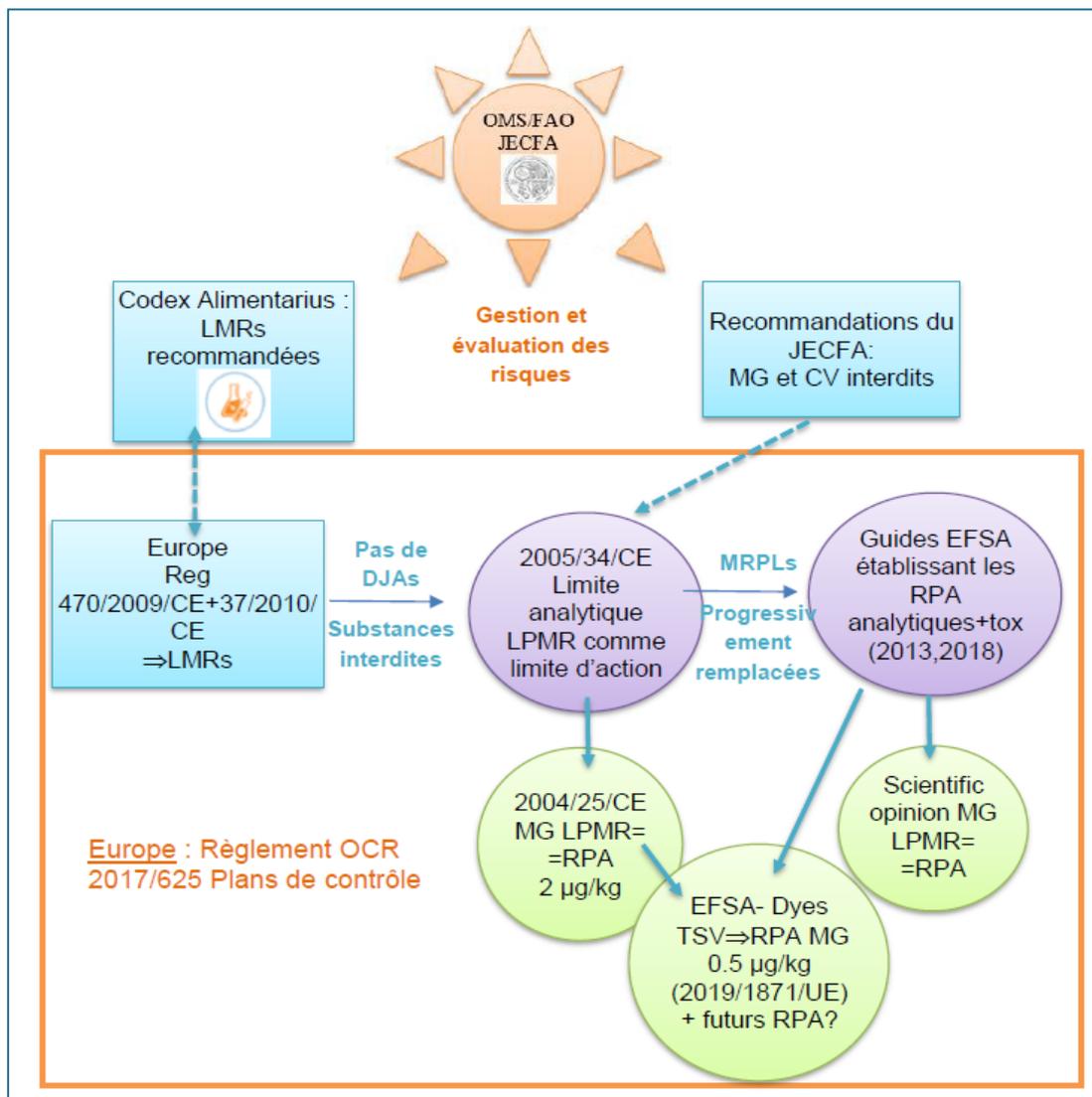


Figure 17 : La réglementation européenne des colorants dans les produits d'aquaculture

En Europe, les règles et limites d'évaluation des risques susmentionnées sont complétées par les exigences en termes de gestion et d'évaluation de risques dont le fondement est issu de la Loi Européenne sur l'Alimentation « General Food Law » (Commission Européenne, 2002b).

En France par exemple, la gestion du risque est assurée par la DGAL qui applique le Règlement 2017/625/UE encore nommé **Règlement OCR** organisant l'ensemble des contrôles officiels (Commission Européenne, 2017). Il concerne les contrôles officiels en Europe et les autres activités officielles menées pour assurer l'application de la législation sur les denrées alimentaires et sur les aliments pour animaux, les règles relatives à la santé et au bien-être des animaux, à la santé des végétaux et aux produits phytopharmaceutiques. Cette nouvelle approche des contrôles officiels est entièrement basée sur les risques et leur évaluation, afin de minimiser les conséquences pour les opérateurs, ce qui ne l'était pas lors de l'application de l'ancienne réglementation inscrite dans la Directive 96/23/CE à présent abrogée (Commission Européenne, 1996). La réglementation définit par ailleurs les plans de prélèvements nationaux par les états membres de l'UE selon que les substances sont non autorisées (ancien Groupe A de la Directive 96/23/CE) ou qu'elles appartiennent au groupe des médicaments vétérinaires autorisés (ancien Groupe B de la même Directive). En France, 499 prélèvements ont été effectués en 2018 pour la filière aquaculture dont 40 pour la famille des colorants. Parmi les 40, 14 prélèvements étaient réalisés de façon ciblée, suite à des non-conformités les années précédentes par exemple.

## 2.2 Les méthodes analytiques de contrôle pour la confirmation des résidus de colorants dans les denrées issues de l'aquaculture

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent, il existe des règles de gestion strictes et d'évaluation des risques concernant le contrôle des molécules non autorisées à activité pharmacologique telles que les colorants dans les produits d'aquaculture. Celles-ci dictent aux laboratoires des limites analytiques à atteindre et certaines autres exigences pour les méthodes de contrôle. Les méthodes doivent être suffisamment sensibles pour permettre la détection des résidus aux limites de performance réglementaires, les LPMRs ou les RPAs. Ces méthodes doivent être également très sélectives pour permettre de trier et identifier, c'est-à-dire de discriminer le résidu de colorant parmi la complexité de molécules provenant de la matrice à caractère lipidique et protéique du poisson. Enfin, les méthodes doivent permettre l'analyse du résidu marqueur métabolique pour ces colorants, que ce soit la molécule parent ou un métabolite issu de cette molécule et permettant de tracer le traitement suffisamment longtemps après l'administration. En d'autres termes, des méthodes analytiques sophistiquées et robustes doivent être développées pour les résidus de colorants interdits dans les matrices complexes et variées de produits d'aquaculture. **Les méthodes de confirmation** définies dans la réglementation rassemblent ces caractéristiques. La confirmation de résidus d'un colorant

spécifié doit fournir des indications non ambiguës sur la structure chimique du composé afin d'être certain de son identification. Ainsi, les méthodes basées sur une séparation chromatographique couplée à des systèmes de détection non équivoques, comme la spectrométrie de masse, sont généralement privilégiées pour confirmer la présence de ces résidus chimiques.

### 2.2.1 Instrumentation : le couplage usuel

**La spectrométrie de masse (MS)** permet non seulement d'identifier de façon univoque, mais également de quantifier de façon fiable, et d'analyser un panel important de molécules. Ces trois caractéristiques la différencient des méthodes biologiques basées sur la détection immuno-enzymatique ou encore de l'inhibition microbienne. D'autre part, la MS combinée à une **séparation chromatographique** en phase gazeuse (**CPG**) ou en phase liquide (**LC**) est un outil de choix accessible et polyvalent, souvent annoncé comme universel, pour identifier et quantifier les résidus chimiques dans les aliments pour animaux et les denrées alimentaires. Elle est particulièrement adaptée pour l'analyse de confirmation qualitative et/ou quantitative de composés aux propriétés physico-chimiques variées en raison de sa grande sélectivité (grâce à la séparation par LC ou GC également) et de sa remarquable sensibilité pour la recherche de traces résiduelles (jusqu'au niveau du ng/kg).

De nos jours, sur le plan des résidus chimiques vétérinaires, les stratégies analytiques basées sur la LC-MS supplantent celles qui utilisent la GC-MS, même si elles doivent être considérées comme complémentaires et fournissent une approche universelle applicable au plus grand nombre de médicaments vétérinaires. Le principe de la détection repose sur la mesure du rapport de masse sur charge ( $m/z$ ) des molécules ionisées (détection du pic pseudo-moléculaire généralement) ainsi que sur leurs produits de fragmentation dans le cas des analyseurs en tandem (**MS/MS**) incluant un quadripôle permettant de fragmenter et quantifier. Les instruments **LC-MS/MS** permettent d'identifier les composés connus et indiqués dans la méthode analytique, ce qui est appelé couramment **le mode ciblé**. Ils permettent également de remonter à la structure chimique de la substance ciblée extraite de l'échantillon biologique à partir de la structure des ions fragmentés détectés d'une part, et à la quantification de l'analyte à partir des mesures comparées à une gamme de calibration d'autre part.

Parmi les différents analyseurs de masse habituellement utilisés pour l'analyse ciblée, le triple quadripôle (QqQ) est le plus largement utilisé pour mesurer et quantifier les résidus de médicaments vétérinaires. Ce sont les systèmes les plus « démocratisés » pour l'analyse de

confirmation des résidus de colorants à l'heure actuelle. La trappe d'ions linéaire (IT pour Ion Trap) fournit des spectres de masse complets (**Full scan**) et permet de réaliser des expériences de fragmentations multiples, dites en **MS<sub>n</sub>** (ions fragments pouvant être fragmentés à leur tour etc), permettant d'accéder à une meilleure information structurale de la molécule et de confirmer l'identité d'éventuels métabolites. Ainsi, le couplage de la trappe linéaire avec un quadripôle (QqLIT) est capable de produire des informations spectrales de type MS<sub>n</sub>, utiles pour l'élucidation de la structure.

Depuis une dizaine d'années, on observe une popularisation des analyseurs de masse à Haute Résolution (**HR**), et en particulier des instruments à temps de vol (TOF) et des systèmes à technologie Orbitrap®. L'Orbitrap® est un analyseur de spectrométrie de masse donnant accès à l'ultra-haute résolution sans avoir recours à un champ magnétique intense (Hardman and Makarov, 2003). Cette trappe orbitale est composée d'une électrode centrale ainsi que d'une électrode externe en forme de cylindre. Les ions sont piégés entre les électrodes par un champ électrostatique. Ces ions possèdent une fréquence d'oscillation axiale variable en fonction de leur ratio masse sur charge, ce qui permet de les séparer. L'Orbitrap® a été couplée par la société Thermo Electron avec un piège ionique linéaire (LTQ) pour former un spectromètre de masse hybride, le LTQ Orbitrap® (**Figure 18**). La précision de la mesure de la masse, la vitesse élevée de transmission des signaux spectrométriques et l'approche sans à priori moléculaire (ou non ciblée) apportent une valeur ajoutée considérable.

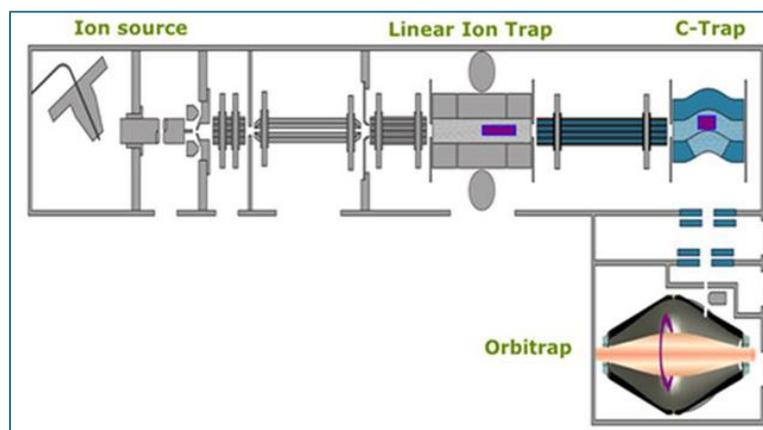


Figure 18 : Représentation schématique du spectromètre de masse hybride LTQ-Orbitrap®  
Source: <https://research.stowers.org/proteomics/MassSpec.html>

La **LC-HRMS**, permettant de discriminer et identifier de façon certaine un composé, d'autant plus lorsque la fragmentation peut être associée, ouvre une autre dimension à l'évaluation de risque (recherche de métabolites multiples, de composés néo-formés, de molécules non recherchées de façon ciblée initialement...). La conséquence est le développement croissant de méthodes analytiques basées sur la HRMS et dédiées aux résidus chimiques issus de classes thérapeutiques extrêmement variées (pesticides, mycotoxines, retardateurs de flamme, ammoniums quaternaires...). Elles embarquent parfois des bibliothèques spectrales dépassant plus de 100 composés et atteignent parfois près de 500 analytes, avec des applications majeures dans le domaine du contrôle des pesticides ou des médicaments vétérinaires. Cependant, les méthodes de confirmation en haute résolution sont encore assez peu nombreuses à tenter de viser les substances interdites au niveau de l'ultra-trace (< ppb). Elles visent plus généralement des applications de type dépistage multi-substances.

Les méthodes détaillées ci-après ne concerneront que les méthodes de confirmation par spectrométrie de masse à basse résolution, et nous aborderons succinctement les méthodes LC-HRMS en citant quelques références.

### **2.2.2 Des méthodes exigeantes pour la confirmation de certains résidus tels que MG, CV, et leurs métabolites (avec ou sans oxydation)**

Depuis les débuts de l'analyse des colorants dans les années 80 principalement par des méthodes spectroscopiques basées sur l'absorbance des ultra-violetts (Poe and Wilson, 1983; Hormazabal et al., 1992), la LC-MS s'est imposée dans les années 2000 comme une méthode de choix pour l'analyse de confirmation des colorants chez les poissons et les crustacés.

#### **↳ Les conditions classiques de détection des colorants**

Parmi les différentes méthodes de MS disponibles, la LC associée à un détecteur de masse triple quadripolaire « QqQ » est la plus couramment utilisée pour la confirmation de MG, CV et leurs métabolites, et parfois BG, mais la trappe ionique « IT » est décrite également (Turnipseed et al., 2005; Wu et al., 2007; Andersen et al., 2009a; Martinez Bueno et al., 2010). Leur séparation chromatographique est généralement effectuée sur des phases stationnaires à polarité de phase inverse de type C18 ou de type phényle pour les greffages (Kaplan et al., 2014). Les gradients de phase mobile couramment rapportés mettent en œuvre une élution par l'acétate d'ammonium (de 10 à 50 mmol) ou l'eau pure acidifiée, et l'ACN ou le MeOH comme contre-solvants plus apolaires (López-Gutiérrez et al., 2013). De nombreuses méthodes ont été publiées concernant l'analyse de MG et CV incluant leurs métabolites persistants sous forme leuco-base comme

nous l'avons vu dans le chapitre 1.3.3 sur le métabolisme. Les composés parents, MG, CV, et BG lorsque ce dernier est inclus, sont détectés sous leur forme cationique  $M^+$  à  $m/z$  329, 372, 385 respectivement, sélectionnés comme ions pseudo moléculaire en champ électropositif dans les sources à pression atmosphérique comme l'ESI ou l'APCI. Les métabolites LMG, LCV, LBG sont par ailleurs analysés sous forme de  $M+H^+$ . Le mode « Multiple Reaction Monitoring (MRM) » en suivant deux transitions par analyte, est désormais systématiquement appliqué grâce aux analyseurs QqQ et QqLIT afin d'obtenir une spécificité nécessaire pour la confirmation moléculaire de l'analyte. Elles permettent d'atteindre des niveaux de détection de l'ordre du  $\mu\text{g/kg}$  voire même la centaine de  $\text{ng/kg}$ , et ce dans des matrices biologiques complexes. D'ailleurs, des étalons internes isotopiques (MG- $d_5$ , LMG- $d_5$ , CV- $d_6$ , LCV- $d_6$ ) sont commercialement disponibles et couramment introduits dans les méthodes. Ils permettent d'apporter une correction aux rendements d'extraction et de résoudre des problèmes tels que les variations d'intensité du signal pendant l'ionisation par électrospray (ESI).

#### ↳ La quantification totale convertie par oxydation

Un certain nombre d'articles ont été publiés sur la détection dans le poisson du MG total extrait après application d'une procédure d'oxydation de toute la substance LMG présente dans l'échantillon (Roybal et al., 1995; Andersen et al., 2005; Turnipseed et al., 2005; Tarbin et al., 2008; Lee et al., 2010). Cette procédure permet de d'oxyder la leuco-base de MG en forme parent et ainsi pouvoir quantifier qu'une seule forme. Le processus d'oxydation a également été appliqué à CV (Chan et al., 2012) et BG, ce qui comporte l'intérêt d'avoir une seule quantification, et dans le cas du BG, l'oxydation pallie le fait de ne pas avoir de standard analytique du LBG (manque de stabilité et standard non commercial). L'analyse totale du BG a aussi été effectuée dans le cadre d'une étude de transfert du BG provenant de la coloration de serviettes en papier et vers la peau (Oplatowska et al., 2011). Les méthodes oxydatives ont tout d'abord été appliquées en réaction post-colonne en utilisant de l'oxyde de plomb ( $\text{PbO}_2$ ) avec des valeurs de limites analytiques  $\text{CC}\alpha$  pour MG de  $0,11 \mu\text{g/kg}$  (Scherpenisse and Bergwerff, 2005) (limite  $\text{CC}\alpha$  explicitée au paragraphe 2.3.1). En 2005, l'extraction présentée par Roybal (Roybal et al., 1995) a été simplifiée et une procédure d'oxydation in situ a été incorporée à la procédure d'extraction afin de convertir la leucobase LMG en MG grâce à l'ajout de 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone (DDQ). Cela permettait une analyse sensible par HPLC-VIS de la somme de MG et LMG dans le saumon et une quantification avec confirmation de l'identité du résidu par LC-MSn à des concentrations inférieures ou égales à  $1 \mu\text{g/kg}$  et une limite analytique  $\text{CC}\alpha$  pour la surveillance réglementaire estimée à  $0,25 \mu\text{g/kg}$  (Turnipseed et

al., 2005). L'oxydation a ensuite été étendue à l'analyse de CV total et BG total avec des limites de quantification estimées entre 0,07 et 0,24 µg/kg (Andersen et al., 2009a). En plus de l'oxydation qui permet après conversion d'analyser une seule forme moléculaire du colorant, certaines méthodes ont inclus des réactifs de stabilisation comme HAH ou TMPD (stabilisation par le pH), *p*-TSA (agissant comme contre-ion à la formation de MG<sup>+</sup>), ou l'acide ascorbique (anti-oxydant) afin d'éviter la déshydrogénation et la déméthylation qui peuvent intervenir spontanément en solution sans passer par la voie du métabolisme du CYP450 (Doerge et al., 1996; Bergwerff and Scherpenisse, 2003).

#### ↳ Les solvants d'extraction

L'extraction de MG, LMG, CV, LCV à partir d'échantillons de chair de poissons et crevettes est le plus souvent effectuée à l'aide de mélanges aqueux tamponnés à faible pH (tampons McIlvaine pH 3, 4.5 ou 6 ou d'acétate d'ammonium) et d'un solvant organique (ACN), mais elle peut également être réalisée à l'aide d'une extraction directe avec des solvants organiques purs tels que l'ACN. Le but de l'étape d'extraction consiste à isoler de la matrice biologique les différents analytes recherchés en se basant sur leurs propriétés physico-chimiques (par exemple: la polarité, l'affinité relative pour les solvants organiques ou aqueux, la solubilité, la masse moléculaire, la taille de la molécule et sa volatilité). En règle générale, pour MG, CV et leurs métabolites, l'extrait liquide obtenu par solvant de type ACN dans une première étape est ensuite soumis à un second partage de type liquide/liquide par ajout de dichlorométhane ou bien à un dégraissage par lavage à l'hexane. Cette étape est souvent nécessaire pour s'affranchir de la partie lipidique chez les poissons gras. Ce dégraissage unique sans purification ultérieure a rarement été appliqué car il engendre sans doute une perte des composés (Doerge et al., 1996; Arroyo et al., 2009). L'absence de purification plus poussée est parfois compensée comme dans l'application de la dilution isotopique (Hall et al., 2008).

#### ↳ Les problèmes d'effets matrices

Lors des développements comprenant plusieurs résidus de colorants, des purifications ont souvent été introduites afin de réduire l'impact de la complexité des matrices sur le signal spectrométrique ou pour éliminer le surplus d'anti-oxydant ou d'acide par exemple. Comme indiqué plus haut, la LC-MS/MS est une technique de choix pour la confirmation identificatrice de la présence de l'analyte. Elle est très sélective et masque la présence dans l'extrait de tous les composés issus de la matrice. Mais la technique d'ionisation par électrospray « ESI » présente l'inconvénient de générer des effets suppresseurs ou exhausteurs de signal de l'analyte

ciblé (colorant). En effet, la présence dans le spray d'une compétition à l'ionisation entre les diverses espèces moléculaires provenant de la matrice biologique est à l'origine de ce phénomène communément appelé « **effets matrices** ». Certaines solutions existent pour limiter leur impact, comme par exemple diluer l'extrait injecté pour réduire la compétition à l'ionisation, injecter la quantité la plus faible possible dans le système (de l'ordre d'1  $\mu\text{L}$  ou moins) tout en conservant un signal suffisant, ou encore intégrer dans la méthode des étapes d'extraction-purification spécifiques basées sur des partages liquide-liquide (LLE) ou liquide-solide (SPE).

#### ↳ Les techniques de purification

L'extraction en phase solide (**SPE**) est un moyen efficace pour la purification des matrices les plus lipidiques comme le saumon et certains autres poissons d'aquaculture. Elle a très souvent été décrite dans le cas d'une analyse pour un nombre très réduit et ciblé de résidus de colorants (Dowling et al., 2007; Halme et al., 2007; Wu et al., 2007; Tao et al., 2011) mais elle comporte l'inconvénient d'être longue et coûteuse. Les SPE appliquées sont constituées de cartouches contenant des adsorbants particuliers soient greffées avec des phases inversées (telle que la phase à greffons C18) (Van De Riet et al., 2005), soit greffées avec des phases échangeuses de cations (tel que les adsorbants à l'acide propylsulfonique) (Lee et al., 2006; Dowling et al., 2007; Wu et al., 2007; Tao et al., 2011; Ascari et al., 2012).

Une purification supplémentaire communément nommée SPE dispersive (**d-SPE**) peut être obtenue assez facilement par addition directe à l'extrait d'adsorbants solides tels que l'alumine ou l'alumine basique ou sous forme de sels liquides, tels que le chlorure de sodium ou les amines primaires/secondaires (Andersen et al., 2009b; Martinez Bueno et al., 2010). Une des méthodes de SPE dispersive reconnue est la technique dite **QuEChERS** pour « Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe » qui a été créée voici plus d'une quinzaine d'années pour faciliter le criblage rapide d'un grand nombre d'échantillons alimentaires et agricoles pour la recherche des résidus de pesticides. Cette technique implique l'utilisation d'une combinaison de sels et d'adsorbants solides pour obtenir une extraction et une purification combinées des molécules de colorants extraites de la matrice biologique de l'échantillon. Hashimoto et al. ont réalisé un plan d'expérience pour l'optimisation expérimentale afin d'extraire des résidus de MG dans le cadre d'un plan de surveillance chez le Tilapia (Hashimoto et al., 2012).

Une autre technique, dite des polymères à empreinte moléculaire (**MIP**), est encore plus sélective car elle est basée sur la capture (trapping) sélective du colorant directement depuis

l'extrait biologique et son transfert dans l'empreinte moléculaire solide adaptée. Plus aucun lavage ni aucune extraction d'impuretés n'est requise. Le MIP est emballé dans une colonne type SPE pour piéger le ou les analytes de l'extrait biologique de l'échantillon et permettre ensuite les étapes successives de lavage avant au final l'élution du ou des analytes de la colonne. Les MIPs impliquent évidemment l'utilisation d'un polymère empreint avec une sélectivité suffisante à la fois pour MG et LMG (Long et al., 2009) ou des polymères empreints spécifiques de MG avec une oxydation pré-MIP du LMG en MG à l'aide de DDQ (Martinez Bueno et al., 2010). Cette technique, appliquée pour MG en 2008 (Li et al., 2008), permet d'accéder à une purification presque parfaite mais comporte l'inconvénient de n'être spécifique qu'à une ou deux structures moléculaires proches comme LMG ou CV.

⇒ Ainsi, les méthodes de confirmation spécifiques à MG, CV, et leurs métabolites ont fait l'objets de nombreuses applications pour leur extraction et leur identification univoque, mettant en œuvre des procédés relativement complexes d'oxydation, de stabilisation et de purifications.

### 2.2.3 Méthodes multi-colorants et multi-familles de colorants

De nombreuses méthodes analytiques permettant de caractériser les résidus de colorants thérapeutiques dans les produits de la mer sont des méthodes spécifiques à une classe.

#### ↳ Des méthodes surtout dédiées aux TAMs

Progressivement, ces méthodes analytiques alors dédiées à l'analyse des résidus de TAMs tels que MG, CV, et leurs métabolites, ont intégré d'autres colorants comme BG, un autre TAM, ou MB, une phénothiazine (**Tableau 7**). Cela a été possible grâce à la caractérisation par Turnipseed et al. de huit colorants (MG, LMG, CV, LCV, BG, MB, et deux métabolites de MB) par un faisceau de particules en LC-MS en étudiant les spectres de fragmentations. Cette technique a été évaluée pour la confirmation du MG et du LMG dans le tissu de poisson chat (Turnipseed et al., 1995).

Certaines méthodes se sont ensuite focalisées uniquement sur la classe des TAMs en incluant BG, du fait d'une possibilité accrue d'utilisation en aquaculture et des préconisations émanant des services officiels de gestion des risques. Les méthodes analytiques incluant BG ou d'autres colorants se sont avérées un peu moins complexes en terme d'extraction et de purification. Les équipes de la FDA de Denver et de l'Anses de Fougères ont travaillé conjointement sur plusieurs années afin d'aboutir à une méthode de référence internationale certifiée par l'AOAC (Hurtaud-Pessel et al., 2011; Hurtaud-Pessel et al., 2013; Andersen et al., 2015). Cette méthode

LC-MS/MS, applicable à MG, LMG, CV, LCV, BG, propose une extraction sans SPE (hydroxylamine, ACN, sulfate de sodium anhydre), afin de quantifier ces résidus dans un grand nombre d'espèces de poissons et de crustacés à des niveaux inférieurs à 2 µg/kg. La méthode de Lopez et al incluant les mêmes colorants, décrit une extraction par la technique Quechers applicable à la truite, au saumon, et aux crevettes à des CC $\alpha$  compris entre 0.37 et 1.22 µg/kg (López-Gutiérrez et al., 2013). Plus récemment, Giaccone et al appliquèrent également la technique de purification Quechers pour l'analyse de ces mêmes résidus par LC-HRMS/MS en utilisant un spectromètre de masse Q-Exactive Orbitrap®, afin d'accéder à un gain en sélectivité et en sensibilité (CC $\alpha$  entre 0.55 et 0.62 µg/kg) (Giaccone et al., 2018). Le but de leur travail était d'étudier les avantages d'une méthode analytique basée sur l'UHPLC couplée à une détection ESI-HRMS/MS pour la détermination quantitative simultanée de MG, LMG, BG, CV et LCV dans plusieurs espèces de poissons (bar, dorade, maquereau, et saumon).

Le méthylène bleu (MB) a également fait l'objet de développements dans les denrées d'aquaculture. Xu et al. ont intégré MB et ses trois métabolites, azure A (AZA), azure B, azure C, à l'analyse des classiques MG, LMG, CV, LCV en réalisant une séparation par UHPLC (Xu et al., 2012). L'extraction était basée sur la procédure de Roybal et al, bien que le choix de l'adsorbant SPE ait été reconsidéré et optimisé (Roybal et al., 1995). En effet, MB et ses métabolites de type « azure » étaient trop fortement adsorbé sur les résines échangeuses fortes de cations de type MCX d'une part; et MG et LMG pas assez retenu sur résines échangeuses faible de cations de type WCX d'autre part. Une cartouche combinant une résine échangeuse de cations et une phase carbonée de type C8 (MCAX, Supelco) s'est avérée appropriée pour la purification de tous les résidus de colorant, afin d'atteindre des niveaux de détermination inférieurs à 0.50 µg/kg.

#### ↳ Vers des méthodes multi-familles et multi-classes

Mais comme pour la tendance générale observée en matière d'analyse de résidus chimiques, des méthodes multi-familles de résidus de colorants et multi-classes de médicaments vétérinaires ont commencé à apparaître en 2008 (**Tableau 7**). Tarbin et al. ont mis au point une méthode quantitative multi-classes de résidus par LC-MS/MS chez le poisson pour les TAMs, les phénothiazines et quelques composés des classes du xanthène et de la phénoxazine (Tarbin et al., 2008). Cette méthode incluait les colorants à visée thérapeutique les plus courants et les plus efficaces utilisés en aquaculture (MG, CV, BG et MB) et élargissait la liste pour inclure d'autres colorants pouvant se substituer à ceux-ci dans leur effet thérapeutique tout en évitant

leur détection lors des contrôles réglementaires. Ont été ainsi insérés notamment, PRRA, EV, VPBO, VBB, VBR, MB, NMB, RHG, NBA, AZB. De manière similaire aux autres procédures existantes, ces colorants ont été extraits de la chair de saumon en utilisant un mélange constitué d'un tampon d'acétate d'ammonium à pH 4,5, d'ACN et d'alumine, suivi d'une étape d'épuration des lipides de l'extrait avec du dichlorométhane, et enfin d'une opération d'oxydation avec le DDQ avant passage sur résine échangeuse de cations (SPE). Etant donné que les matières premières standards de leuco-métabolites ne sont disponibles que pour MG et CV, l'ajout d'un processus d'oxydation convertit les leuco-métabolites des colorants TAM et phénothiazines en leur composé parent chromique en vue d'une détection simplifiée.

Reyns et al. ont par la suite entrepris d'améliorer cette méthode pour la détection de l'usage illégal de colorants en aquaculture (Reyns et al., 2014). Les 12 substances incluses comprenaient celles proposées par Tarbin et al., auxquelles s'ajoutait la RHB. La procédure d'extraction a été modifiée pour permettre une extraction adaptée à la chair d'anguille au moyen d'un mélange d'ACN et d'acétate de sodium suivie d'une élimination lipidique au dichlorométhane. L'étape d'oxydation a également été ajoutée pour convertir les métabolites de type leuco, suivie d'une double SPE d'abord sur résine polymérique à échange cationique faible (WCX) puis sur résine échangeuse forte de cations (MCX). Cette méthode a été validée sur la plage de concentrations allant de 0,25 à 1,0 µg/kg en utilisant une instrumentation de type UHPLC-MS/MS.

Une méthode similaire mais étendue aux familles de colorants non thérapeutiques, celle de Amelin et al., proposa une combinaison de préparation d'échantillons simple et rapide avec l'identification simultanée de 22 colorants (TAMs, phénothiazines, acridines, soudans) dans les épices et les produits d'aquaculture (Amelin et al., 2017). Les colorants ont été déterminés par leurs masses exactes en haute résolution et quantifiés par ajouts dosés. Cette méthode a généré des niveaux de quantification très intéressants, inférieurs à 0.1 µg/kg pour les principaux colorants, mais n'est cependant pas une méthode de confirmation puisqu'elle ne rassemble pas suffisamment de critères d'identification recommandés dans la Décision 2002/657/CE (voir Chapitre 2.3).

Tableau 7 : Méthodes d'analyses des colorants dans les produits d'aquaculture avec détection par spectrométrie de masse

| <i>Colorants analysés</i>   | <i>Matrice</i>  | <i>Préparation d'échantillons</i>  | <i>Méthode d'analyse</i>    | <i>Colonne</i>   | <i>Limites analytiques (LOD ou CC<math>\alpha</math>)</i> | <i>Référence</i>                   |
|---|---|--|-----------------------------|--|---|------------------------------------|
| <b>Méthodes de confirmation comprenant moins de 3 colorants (triarylméthanés)</b> |   |  |                             |  |   |                                    |
| <i>MG</i>   | poisson chat  | acétate de sodium, HAH, p-TSA, ACN, d-SPE  | Particle beam-LC-MS         | Ultracarb C18  | 20 $\mu$ g/kg   | (Turnipseed et al., 1995)          |
| <i>CV, LCV</i>  | poisson chat  | acétate d'ammonium, HAH, p-TSA, ACN  | LC-APCI-MS                  | SCD 100 (5 $\mu$ m, 250 $\times$ 4.6 mm) SynChrom                        | < 1 pg  | (Doerge et al., 1996)              |
| <i>MG, LMG</i>  | poisson chat  | acétate d'ammonium HCl, acide p-toluène sulfonique, ACN, SPE   | isotope dilution LC-APCI-MS | Prodigy ODS-3 (5 $\mu$ m, 4.6 $\times$ 250 mm) Phenomenex                | 0.02 $\mu$ g/kg (pour MG), 0.5 $\mu$ g/kg (LMG)           | (Doerge et al., 1998)              |
| <i>MG, LMG</i>  | poisson chat, anguille, truite, saumon, turbot, crevettes | Tampon McIlvaine à pH 3 puis pH 6, ACN, SPE cations (acide sulfonique)   | LC-MS/MS                    | Luna C18 (3 $\mu$ m, 50 $\times$ 2 mm) Phenomenex Post colonne oxidation | 0.2 $\mu$ g/kg  | (Bergwerff and Scherpenisse, 2003) |
| <i>MG, LMG</i>  | truite  | acétate d'ammonium, HAH, p-TSA, ACN, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , SPE automatisée ASPEC (échange cations, acide sulfonique) | LC-MS/MS                    | Chromspher 5B, Post colonne oxidation                                    | 2.5 $\mu$ g/kg (pour MG) 1 $\mu$ g/kg (pour LMG)          | (Halme et al., 2004)               |
| <i>MG, LMG</i>  | saumon, truite, panga, tilapia, perche                    | McIlvaine buffer pH3, ACN, SPE(échange cations, acide sulfonique)  | LC-MS/MS                    | Luna C18 (3 $\mu$ m, 150 $\times$ 2.0 mm) Phenomenex                     | 0.11 $\mu$ g/kg (pour MG et pour LMG)                     | (Scherpenisse and Bergwerff, 2005) |

Partie I : synthèse bibliographique

|  |   |   |  |  |   |                                  |
|--|---|---|--|--|---|----------------------------------|
| <i>MG, LMG</i><br>(convertit<br>en MG) | saumon  | Tampon acétate,<br>ACN, oxidation<br>DDQ  | LC-<br>APCI/MS   | YMC<br>phenyl 3-<br>4-5 (3<br>µm, 4.0 ×<br>50mm)<br>Waters                                 | 0.25 µg/kg  | (Turnipsee<br>d et al.,<br>2005) |
| <i>MG, LMG</i>                         | saumon,<br>truite,<br>tilapia,<br>crevettes                               | ACN acidifié,<br>SPE en C18   | LC-<br>MS/MS   | Luna C18<br>(5 µm,<br>150 ×<br>2mm)<br>Phenome<br>nex                                      | 0.5 µg/kg   | (Van De<br>Riet et al.,<br>2005) |
| <i>MG, LMG</i>                         | truite  | Tampon acétate,<br>SPE automatisée<br>ASPEC (échange<br>cations, acide<br>sulfonique)               | LC-<br>MS/MS   | Zorbax<br>Eclipse<br>XDB-C18<br>(3.5<br>µm, 150 ×<br>2.1mm)<br>Agilent<br>Technolo<br>gies | 0.13 µg/kg<br>(pour MG)<br>0.16 µg/kg<br>(pour LMG) | (Halme et<br>al., 2007)          |
| <i>MG, LMG</i>                         | poisson<br>chat,<br>truite,<br>tilapia,<br>panga,<br>saumon,<br>crevettes | Acétate<br>d'ammonium,<br>HAH, ACN  | IT-LC-<br>MS <sup>n</sup>  | Alltima<br>C18 (3<br>µm, 4.6 ×<br>150 mm)<br>Alltech                                       | 0.25 µg/kg  | (Andersen<br>et al., 2006)       |
| <i>MG, LMG</i>                         | poisson<br>rouge<br>comestible  | ACN acidifié,<br>SPE échange<br>cations (acide<br>sulfonique)                                       | IT-LC-<br>MS-MS  | Beta-<br>basic C18<br>( 5µm, 50<br>× 2 mm)   | 0.13 µg/kg<br>(pour MG)<br>0.06 µg/kg<br>(pour LMG) | (Lee et al.,<br>2006)            |
| <i>MG,<br/>LMG, CV,<br/>LCV</i>        |   | acétate<br>d'ammonium pH<br>4.5, ACN, SPE<br>échange cations<br>(acide<br>sulfonique),<br>oxidation | LC-<br>MS/MS   | Capcell<br>PAK C18<br>(5 µm,<br>4.6 ×<br>250mm)  | 1 µg/kg   | (Lee et al.,<br>2010)            |
| <i>MG,<br/>LMG, CV,<br/>LCV</i>        | carpe,<br>anguille,<br>saumon,<br>crevette,<br>crustacés                  | Tampon Mc<br>Illvaine, ACN,<br>SPE échange<br>cations MCX   | LC-<br>MS/MS,<br>dilution<br>isotopique<br>,<br>oxidation<br>post<br>colonne | (5 µm,<br>2.0mm×1<br>50 mm),<br>Shiseido   | entre 0.02 et<br>0.04 µg/kg                         | (Wu et al.,<br>2007)             |

Partie I : synthèse bibliographique

|                                  |                                |   |                                  |  |   |                               |
|----------------------------------|--------------------------------|---|----------------------------------|--|---|-------------------------------|
| <i>MG, LMG, CV, LCV</i>          | saumon                         | Tampon Mc Illvaine pH 3, ACN, SPE échange cation MCX  | LC-MS/MS                         | C18 (3 µm, 100 × 2.0 mm) Phenomenex                                      | 0.17 (MG), 0.15 (LMG), 0.35 (CV) and 0.17 (LCV) µg/kg | (Dowling et al., 2007)        |
| <i>MG, LMG</i>                   | saumon                         | Tampon Mc Illvaine pH 4.5, ACN  | LC-MS/MS, dilution isotopique    | Symmetry C18 (3.5 µm, 75 × 4.6mm) Waters                                 | 2 µg/kg   | (Hall et al., 2008)           |
| <i>MG, LMG</i>                   | bar, truite, daurade et turbot | hydroxylamine, ACN  | LC-MS/MS                         | Synergi MAX-RP (4 µm, 150 × 2.0 mm) Phenomenex                           | 0.45-0.55 µg/kg                                       | (Arroyo et al., 2009)         |
| <i>MG, LMG, CV, LCV</i>          | poisson chat                   | Tampon Mc Illvaine pH 3, ACN, SPE échange cation  | LC-MS/MS, oxidation post colonne | Prodigy ODS-3 C18 (3 µm, 100 mm × 2.0 mm) Phenomenex                     | 0.5 µg/kg   | (Chen and Miao, 2010)         |
| <i>MG, LMG (convertit en MG)</i> | saumon                         | Acétate d'ammonium, hydroxylamine, ACN, SPE dispersive, oxidation, MIP  | LC-MS/MS                         | Eclipse XDB-C8 (5 µm, 150 × 4.6 mm) Agilent Technologies                 | 3-20 ng/kg  | (Martínez Bueno et al., 2010) |
| <i>MG, LMG, CV, LCV</i>          | saumon, crevette               | Extraction Accélérée par Solvant (ASE) avec tampon Mc Illvaine (pH 3)/acetonitrile/hexane, p-TSA, TMPD, SPE MCX | LC-MS/MS                         | Hypersil Gold C18 (3.5 µm, 150 × 2.1 mm) Thermo                          | 0.005-0.012 µg/kg                                     | (Tao et al., 2011)            |
| <i>MG, LMG, CV, LCV</i>          | saumon, crevette               | Tampon citrate, ACN, NaCl, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , SPE SCX  | LC-MS-MS                         | C18 (5 µm, 150 × 2.0 mm) ACE, oxidation post colonne (PbO <sub>2</sub> ) | 0.164-0.860 µg/kg                                     | (Ascari et al., 2012)         |

Partie I : synthèse bibliographique

|                |         |   |              |   |                    |                             |
|----------------|---------|---|--------------|---|--------------------|-----------------------------|
| <i>CV, LCV</i> | saumon  | Méthode 1:<br>acétate<br>d'ammonium,<br>ACN, oxidation,<br>SPE SCX<br>Méthode 2:<br>tampon citrate,<br>ACN, SPE SCX | LC-<br>MS/MS | Méthode<br>1:<br>Xbridge<br>C18 (3.5<br>µm, 100 ×<br>2.1 mm),<br>Waters<br>Méthode<br>2:<br>HyPurity<br>C18 (3<br>µm, 50 ×<br>2.1 mm)<br>Thermo | 2 µg/kg            | (Chan et<br>al., 2012)      |
| <i>MG, LMG</i> | tilapia | ACN, acide<br>acétique,<br>Quechers: MgSO <sub>4</sub><br>anhydre, PSA  | LC-<br>MS/MS | C18<br>Xterra (5<br>µm, 150 ×<br>2.1 mm)<br>Waters  | 0.25-0.38<br>µg/kg | (Hashimoto<br>et al., 2012) |

| <i>Colorants<br/>analysés</i>   | <i>Matrice</i>                 | <i>Préparation<br/>d'échantillons</i>  | <i>Méthode<br/>d'analyse</i> | <i>Colonne</i>   | <i>Limites<br/>analytiques<br/>(LOD ou<br/>CC<sub>α</sub>)</i> | <i>Référence</i>   |
|---|--------------------------------|--|------------------------------|--|--|--|
| <b>Méthodes de confirmation multi-colorants et multi-familles de colorants</b>                            |                                |  |                              |  |  |  |
| <i>MG, LMG,<br/>CV, LCV,<br/>EV, PRRA,<br/>VBR,<br/>VPBO, MB,<br/>NMB, BG,<br/>VBB, RHG,<br/>AZB, NBA</i> | saumon                         | acétate<br>d'ammonium,<br>ACN, Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ,<br>acide<br>formique,<br>oxidation<br>DDQ, SPE<br>échange<br>cations SCX         | LC-<br>MS/MS                 | Xbridge<br>C18 (3.5<br>µm, 100 ×<br>2.1 mm)<br>Waters  | 1.1-14 µg/kg   | (Tarbin et al.,<br>1998)   |
| <i>MG, LMG,<br/>CV, LCV,<br/>BG</i>   | poisson<br>chat                | acétate<br>d'ammonium,<br>HAH, p-TSA,<br>ACN,<br>Alumine,<br>dichlorométha<br>ne, oxidation<br>DDQ, SPE<br>alumine+acide<br>propylsulfoniq<br>ue | IT-LC-<br>MSn                | YMC<br>phenyl 3-<br>4-5 (3<br>µm, 50 ×<br>4.0mm)       | 0.07–0.24<br>µg/kg   | (Andersen et<br>al., 2009)   |
| <i>MG, LMG,<br/>CV, LCV,<br/>BG</i>   | truite,<br>saumon,<br>crevette | acétate<br>d'ammonium,<br>HAH, ACN,<br>sulfate de<br>sodium<br>anhydre   | LC-<br>MS/MS                 | Symmetry<br>C18 (3.5<br>µm, 100 ×<br>2.1 mm)<br>Waters | 0.13-0.42<br>µg/kg   | (Hurtaud-<br>Pessel et al.,<br>2011)<br>(Hurtaud-<br>Pessel et al.,<br>2013) |

Partie I : synthèse bibliographique

|   |   |  |             |  |                 |                                |
|---|---|--|-------------|--|-----------------|--------------------------------|
| <i>MG, LMG, CV, LCV, MB, azure A azure B, azure C</i>   | carpe   | acétate d'ammonium, ACN, dichlorométhane, SPE échange cations MCAX   | UPLC-MS/MS  | Acquity BEH C18 (1.7 µm, 2.1 × 100 mm) Waters            | 0.15-0.30 µg/kg | (Xu et al., 2012)              |
| <i>MG, LMG, CV, BG</i>  | saumon, truite, crevette                                      | Eau/ACN + acide formique, Quechers                                   | LC-MS/MS    | Kinetex C18 (2.6 µm, 50 × 2.1 mm) Phenomenex             | 0.37-0.92 µg/kg | (López-Gutiérrez et al., 2013) |
| <i>MG, LMG, CV, LCV, BG</i>   | truite  | ACN, acide acétique  | LC-MS/MS    | Inertsil ODS-4 (3 µm, 50 × 2.1 mm) GL Sciences           | 0.17-0.43 µg/kg | (Kaplan et al., 2014)          |
| <i>MG, LMG, CV, LCV, EV, PRRA, VBR, VPBO, MB, NMB, BG, VBB, RHG, RHB, AZB, NBA</i>  | tissus de poissons, anguille                                  | ACN, acétate de sodium, oxydation DDQ, SPE CBA et échange d'ions SCX | LC-MS/MS    | Acquity UPLC BEH C18 (1.7 µm, 2.1 × 100 mm) Waters       | <1 µg/kg        | (Reyns et al., 2014)           |
| <i>MG, LMG, CV, LCV, BG</i>   | saumon, poisson chat, tilapia, crevette                       | acétate d'ammonium, HAH, ACN, sulfate de sodium anhydre              | LC-MS/MS    | Symmetry C18 (3.5 µm, 100 × 2.1 mm) Waters               | 0.05-0.24 µg/kg | (Andersen et al., 2015)        |
| <i>MG, LMV, CV, LCV, BG, LBG, MB, leuco MB, methyl violet, azure A, B, C, acriflavine, acridine yellow, dimethyl yellow, methyl red, para red, sudan I, II,</i> | crevette, truite, saumon, carpe, maquereau, caviar, écrevisse | ACN, eau, dilution   | LC-Q-TOF-MS | Acclaim 120 C18 (2.2 µm, 150 × 2.1 mm) Thermo Scientific | 0.01-0.4 µg/kg  | (Amelin et al., 2017)          |

Partie I : synthèse bibliographique

|  |                                 |   |                    |  |                 |                         |
|--|---------------------------------|---|--------------------|--|-----------------|-------------------------|
| <i>III, IV, chrysoïdine</i>  |                                 |   |                    |  |                 |                         |
| <i>MG, LMG, CV, LCV, BG, LBG</i>   | bar, daurade, maquereau, saumon | HAH, ACN, tampon citrate, SPE dispersive Quechers | LC-Q-exactive-HRMS | Hypersil Gold C18 reversed-phase UHPLC column (1.9 µm, 50 × 2.1mm) Thermo Scientific | 0.55-0.62 µg/kg | (Giaccone et al., 2018) |
| <i>MG, LMG, CV, LCV, EV, PRRA, VBR, VPBO, MB, NMB, BG, VBB, RHG, RHB, AZB, NBA</i> | truite, saumon, crevette        | ACN, MgSO <sub>4</sub> , oxydation DDQ            | LC-MS/MS           | Kinetex C18 (2.6 µm, 100 × 2.1 mm) Phenomenex  | 0.02-0.42 µg/kg | (Dubreil et al., 2019)  |

| <i>Composés analysés</i>  | <i>Matrice</i>                        | <i>Préparation d'échantillons</i>         | <i>Méthode d'analyse</i> | <i>Colonne</i>  | <i>Limites analytiques (LOD ou CCα)</i> | <i>Référence</i>        |
|---|---------------------------------------|---|--------------------------|---|---|-------------------------|
| <b>Méthodes multi-familles comprenant des colorants et d'autres Rés. Méd. Vét.</b>  |                                       |   |                          |   |   |                         |
| <i>antibiotiques (enrofloxacin, acide oxolinique, flumequine, erythromycine) ; fongicides (MG, LMG) et parasiticide (emamectine benzoate)</i>                 | saumon                                | ACN, acide acétique, NaCl, SPE dispersive | LC-TOF-MS                | Zorbax SB-C18 (5 µm, 3 × 250 mm) Agilent Technologies | 8 (MG) - 38 µg/kg (LMG)                 | (Hernando et al., 2006) |
| <i>38 composés de classes différentes (quinolones, macrolides, imidazoles, sulfamides, tétracyclines, betalactamines, amphenicols) et colorants (MG, LMG)</i> | truite, saumon, poisson chat, tilapia | ACN, hexane                               | LC-IT-MS                 | Phenyl S-3, (3µm, 4.0 × 50mm) YMC                     | 10-1000 µg/kg                           | (Smith et al., 2009)    |

Partie I : synthèse bibliographique

|   |   |  |                    |   |                           |                                |
|---|---|--|--------------------|---|---------------------------|--------------------------------|
| <i>Chorure de benzalkonium, ethoxyquine, mebendazole, sulfadiazine, sulfadimethoxine, sulfamethazine, sulfamethizole, sulfanilamide, sulfapyridine, sulfathiazole, trimethoprime, et MG, LMG</i>  | crevette  | ACN, Quechers  | LC-TOF-MS          | RR Zorbax Eclipse XDB-C18 (1.8 µm, 50 × 4.6mm) Agilent Technologies | 0.06 (MG)-0.6 µg/kg (LMG) | (Villar - Pulido et al., 2011) |
| <i>13 sulfamides, trimethoprime, 3 fluoroquinolones, 3 quinolones, 1 hormone, et colorants : MG, LMG, CV, LCV, BG</i>   | poisson chat, anguille, poisson panga, charbonnier, tilapia, poisson swai, saumon, truite, crevette | Tampon EDTA-McIlvaine, ACN, p-TSA, TMPD              | LC-MS/MS           | ODS-AQ (3 µm, 2 × 100 mm) YMC                                       | 0.097-0.451 µg/kg         | (Storey et al., 2014)          |
| <i>chloramphenicol, MG, LMG, nitrofuranes (metabolites), +76 herbicides</i>   | Coquillages (moules, huitres)   | ACN, n-hexane, pour nitrofuranes: LLE+dérivatisation | LC-MS/MS           | Non donné   | <0.5 µg/kg                | (Chang et al., 2016)           |
| <i>80 Vet Drugs de 12 familles incluant benzimidazoles, β-lactamines, lincosamides, macrolides, nitroimidazoles, quinolones, sulfamides et trimethoprime, tetracyclines, triarylméthanes, amphénicols, estrogènes non stéroïdiens et hormones stéroïdiennes</i> | <i>Oplegnathus punctatus</i> (poissons marins)  | ACN, MeOH, acide acétique, EDTA                      | LC-Q-exactive HRMS | Acquity UPLC BEH C18 (100 × 2.1 mm, 1.7 µm) Waters                  | 1.91-1001.13 µg/kg        | (Zhao et al., 2017)            |

## Partie I : synthèse bibliographique

|  |   |   |                           |  |                      |                                     |
|--|---|---|---------------------------|--|----------------------|-------------------------------------|
| <i>Confirmation:</i><br>16 sulfamides,<br>2 tetracyclines,<br>11<br>(fluoro)quinolones,<br>7<br>nitroimidazoles,<br>3 amphenicols,<br>5 stéroïdes, and 3<br>stilbènes<br>Screening:5<br>colornats<br>triphénylmethane,<br>2 sulfamides, 2<br>tetracyclines, et 1<br>amphenicol | saumon<br>(poisson<br>gras),<br>tilapia<br>(poisson<br>maigre),<br>crevettes<br>(crustacés<br>) | ACN, acide<br>formique  | LC-<br>MS/MS              | Waters<br>(50 × 2.1<br>mm, 1.7<br>µm) HSS<br>T3 UPLC                         | 0.1 µg/kg            | (Gibbs<br>et al.,<br>2018)          |
| <i>VDs incluant</i><br>quinolones,<br>fluoroquinolones,<br>avermectines,<br>triarylméthanes,<br>aminopénicillines  | Poisson<br>chat,<br>truite,<br>saumon,<br>anguille,<br>croasseur<br>jaune,<br>tilapia           | acide p-<br>toluène<br>sulfonique,<br>acide acétique,<br>ACN, SPE   | LC-Q-<br>exactive<br>HRMS | Ascentis<br>Express<br>C18<br>(7.5 cm ×<br>2.1 mm,<br>2.7 µm)<br>Supelco     | 1-200 µg/kg          | (Turni<br>pseed<br>et al.,<br>2018) |
| <i>sulfamides,<br/>tetracyclines,<br/>quinolones, MG</i>   | huître,<br>pétoncle,<br>calmar,<br>seiche   | ACN, acide<br>acétique,<br>Quechers   | UHPLC-<br>MS/MS           | ACQUIT<br>Y UPLC<br>BEH  | <0.8 µg/kg           | (Chen<br>et al.,<br>2019)           |
| <i>21 substances<br/>interdites incluant</i><br>nitroimidazoles,<br>nitrofuranes,<br>triarylméthanes,<br>chloramphenicol   | saumon,<br>truite,<br>crevette  | HCl,<br>dérivatisation<br>(nitrobenzaldé<br>hyde),<br>K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ,<br>isohexane,<br>NaCl, EtOAc,<br>ACN, MgSO <sub>4</sub> | LC-<br>MS/MS              | Symmetry<br>C18<br>analytical<br>column (5<br>µm, 100 ×<br>2.1 mm)<br>Waters | 0.067-1.655<br>µg/kg | (Chen<br>et al.,<br>2020)           |

### 2.2.4 La HRMS au service de la détection de multi-classes de résidus

Les méthodes multi-classes d'analyse de résidus de médicaments vétérinaires ont connu un véritable essor avec l'apparition et le développement des technologies de haute résolution en masse : HRMS. L'analyse multi-résidus de médicaments vétérinaires à l'état de traces dans des matrices telles que les poissons et fruits de mer est une tâche ardue compte tenu de la complexité inhérente de la matrice (types de chair différents, taux de lipides variables selon les espèces et la nourriture, peau élastique). Grâce à sa sélectivité, la HRMS a permis le franchissement d'une nouvelle étape afin d'élargir le champ des analytes et contrer les restrictions inhérentes aux

processus de traitement et de purification des échantillons nécessaires, bien souvent fastidieux et onéreux.

#### ↳ Des méthodes d'extraction plus simples

Aussi, la plupart de ces méthodes basées sur la détection par HRMS ont été conçues avec une première étape d'extraction simplifiée proposant un solvant polyvalent, suivi d'une étape de SPE dispersive (**Tableau 7**). Smith et al proposent par exemple une simple extraction avec de l'ACN et de l'hexane pour cribler et confirmer 38 composés appartenant à diverses classes de médicaments (quinolones et fluoroquinolones, macrolides, MG, et la plupart des imidazoles dans quatre espèces de poissons (truite, saumon, poisson-chat et tilapia) (Smith et al., 2009).

Plusieurs auteurs ont intégré la technique dispersive communément appelée « Quechers » à leur extraction de composés multi-familles (Villar-Pulido et al., 2011; Chang et al., 2016; Zhao et al., 2017; Chen et al., 2019). Les méthodes d'analyse basées sur la détection par HRMS balayent désormais un grand nombre de familles sans pour autant faire un important compromis sur la sensibilité de la détection. Villar Pulido et al. ont présenté un screening quantitatif par LC-TOF-MS mis au point pour le dosage quantitatif simultané dans les crevettes de résidus d'antibiotiques et autres types de médicaments vétérinaires, ainsi que le couple MG et LMG. Les limites analytiques de détection « LOD » atteintes étaient de 0.06 µg/kg pour MG et 0.6 µg/kg pour LMG (Villar-Pulido et al., 2011).

Une méthode de criblage par LC-Orbitrap®-HRMS pour la détection et l'identification des médicaments vétérinaires comprenant des quinolones, des fluoroquinolones, des avermectines, des colorants et des pénicillines a été comparée à des méthodes officielles pour le dosage de ces résidus dans les poissons (Turnipseed et al., 2018). Les quantités des composés parents de colorants (BG, MG et CV) trouvées par dépistage HRMS sur échantillons de saumon étaient dans l'ensemble similaires à celles quantifiées par la méthode officielle ; pour la truite des valeurs légèrement inférieures ont été estimées. CV n'a pas été détecté par la méthode HRMS, cependant à des concentrations très faibles de l'ordre de 0,1 µg/kg.

#### ↳ Des méthodes souvent applicables pour le dépistage

De par leur grande capacité de détection moléculaire en mode full scan, où la totalité des signaux spectrométriques peuvent être acquis sur une gamme de masse donnée, ces méthodes sont particulièrement adaptées au dépistage qualitatif ou (semi-)quantitatif des médicaments, sans aller jusqu'à leur confirmation. Une méthode peut être intentionnellement développée à

des fins de dépistage, soit parfois la méthode validée manque d'un certain nombre de point d'identifications nécessaires (manque de résolution en masse, précision trop élevée, ions diagnostiques insuffisants), en particulier pour la confirmation de colorants pouvant être présents à l'état d'ultra-traces (voir Chapitre 2.3). Hernando et al. ont cependant présenté une méthode LC-TOF-MS mise au point pour la confirmation simultanée par une mesure de masse précise et par une détermination quantitative d'antibiotiques, de fongicides (MG, LMG) et d'antiparasitaires dans la partie comestible du saumon (Hernando et al., 2006). La confirmation a été assurée grâce à la possibilité offerte par l'instrument HRMS d'appliquer différentes énergies de collision. Pour les composés non autorisés (MG et LMG), les limites de détection atteignaient 2 µg/kg et 1 µg/kg respectivement, mais dépassaient la limite de performance minimale requise (LPMR) prescrite dans la législation européenne et qui était fixée à cette époque pour la somme de MG et LMG à 2 µg/kg. Les critères de confirmation nécessaires seront spécifiés dans le paragraphe suivant consacré aux critères et performances de validation des méthodes d'analyses de résidus de médicaments vétérinaires.

Ces méthodes de dépistage, incluant des médicaments autorisés et d'autres interdits, sont néanmoins performantes, car elles livrent des résultats de mesures d'exposition et répondent alors à des problématiques sanitaires particulières ou à des enquêtes épidémiologiques. Ainsi, dans le cadre de l'application d'une méthode par LC-Orbitrap®-HRMS incluant 80 médicaments vétérinaires, dont les TAMs, recherchés chez une espèce aquacole importante en Chine, *Oplegnathus punctatus*, 42 échantillons comprenant des palourdes d'eau de mer, des palourdes d'eau douce et des huîtres, ont été collectés et passés au crible analytique dans des fermes aquacoles et dans des zones de production à Taïwan en 2012 (Chang et al., 2016). Aucun résidu de MG et LMG n'ont été détectés à des limites de quantification entre 0.25 et 0.5 µg/kg.

### **2.3 Performances et validation des méthodes d'analyse de résidus de substances interdites telles que les colorants**

Le développement d'une méthode d'analyse de résidus de substances interdites va mener à l'évaluation de sa fiabilité avant toute utilisation en routine, afin de ne pas passer à côté de l'identification de la substance potentiellement dangereuse lors de sa recherche d'une part, et afin de maîtriser le risque lié à la valeur quantitative annoncée d'autre part. L'exercice de validation est défini comme « *la confirmation par examen et l'apport de preuves objectives du fait que les prescriptions particulières en vue d'une application prévue déterminée sont remplies* » (ISO 17025:2017) (ISO/IEC, 2005). Elle permet d'établir, par une série d'études

expérimentales, que les performances de la méthode vont satisfaire aux critères spécifiés dans des textes de référence. Ces critères exigés pour l'application de la méthode dans des conditions données (règlementation du contrôle officiel par exemple). Les critères de performance sont exprimés en termes de caractéristiques analytiques. La validation d'une méthode de chimie analytique quantitative passe par l'estimation de l'erreur de justesse, ou biais systématique, et de l'erreur aléatoire ou précision de mesure, qu'il faut combiner pour vérifier si la méthode remplit les objectifs qui lui ont été assignés.

Dans le domaine du contrôle de résidus chimiques dans les aliments, des efforts importants ont été consacrés à la définition de critères de validation, donnant ainsi lieu à des documents de référence ayant pour objectif de définir les exigences de validation des méthodes. Dans l'UE, la **Décision 2002/657/CE** (Commission Européenne, 2002a) est un document réglementaire essentiel en ce qui concerne les exigences applicables aux techniques de séparation et de détection et à la validation des méthodes d'analyse utilisées pour le contrôle des résidus de médicaments vétérinaires. Il comprend des définitions et des recommandations sur la manière d'évaluer la justesse, la récupération, la répétabilité, la robustesse et d'autres caractéristiques de performance comme les limites analytiques.

Le type de méthode et le but recherché en contrôle déterminent **les caractéristiques de performance analytique** à évaluer. L'approche de validation qui est proposée dans cette décision est une approche caractéristique par caractéristique. D'autres approches de validation existent notamment celle présentant la validation selon un profil d'exactitude aussi appelée « approche globale ». Celle-ci s'applique notamment dans le domaine pharmaceutique (Hubert et al., 2004; Hubert et al., 2007a; Hubert et al., 2007b). Pour les méthodes de confirmation de résidus de substances vétérinaires interdites, les caractéristiques de validation requises (**Figure 19**) sont :

↳ les critères d'identification,

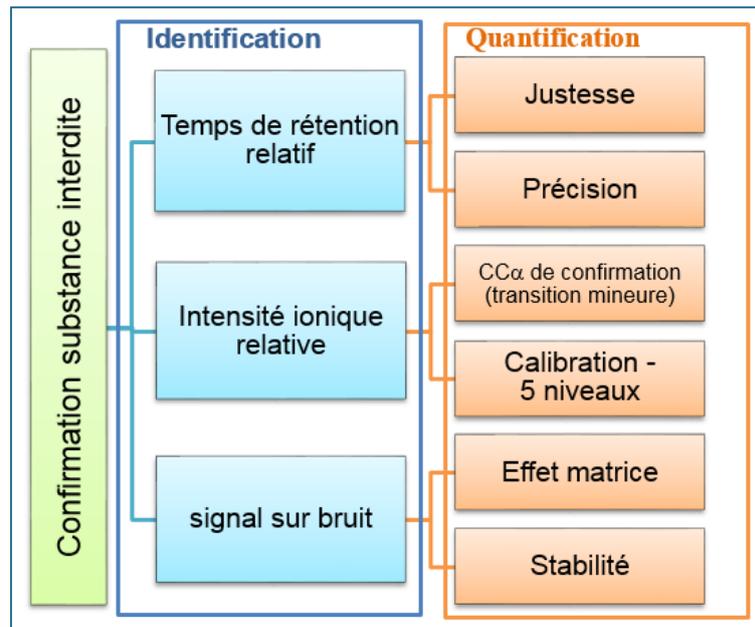
- temps de rétention absolu et/ou relatif
- rapport signal/bruit de fond
- intensité ionique relative appelée aussi tolérance entre transitions ioniques (pour les techniques par détection MS uniquement)

↳ les critères de quantification,

- la spécificité,
- la plage de linéarité de la calibration,

- la fidélité (répétabilité et reproductibilité à minima au sein du laboratoire),
- la justesse,
- l'effet matrice,
- les conditions de stabilité des résidus en solution standard et dans la matrice biologique,

↳ les limites analytiques : la limite de décision ( $CC\alpha$ ) et la capacité de détection ( $CC\beta$ ).



**Figure 19 : Critères de performances à évaluer dans le cas de la validation d'une méthode de confirmation de résidus de substances interdites dans les denrées alimentaires.**

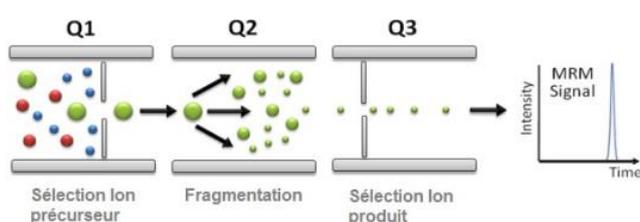
Dans notre étude, l'exercice de validation a été réalisé selon le Guide interne de l'Anses Fougères dédié aux méthodes analytiques de confirmation utilisant la LC-MS/MS. Il est basé sur la Décision de la Commission Européenne Européenne 2002/657/CE et sur la norme ISO 17025 :2017 (Commission Européenne, 2002a; ISO/IEC, 2005). Ce guide s'applique au domaine de l'analyse des résidus de médicaments vétérinaires et autres substances actives dans le cadre du contrôle réglementaire dans les denrées d'origine animale. Il traite donc également des molécules interdites telles que les colorants. Les différentes caractéristiques définies lors d'une validation sont explicitées dans ce chapitre, et font l'objet d'une illustration ou d'une explicitation particulière pour les substances interdites lorsqu'il y a lieu. De plus, la Décision 2002/657/CE connaît actuellement une phase de révision et de mise à jour réglementaire suite aux évolutions du contrôle officiel européen décrites dans le règlement 2017/625/UE. Elle sera très prochainement remplacée par un nouveau document pour l'instant désigné sous le terme SANTE 2018-11188, dans lequel certains critères de performances évolueraient. Les points

importants concernant cette révision sont succinctement abordés dans les 2 paragraphes suivants.

### 2.3.1 L'Identification primordiale des substances interdites

#### ↳ Les Points d'identifications et transitions ioniques relatives

La Décision 2002/657/CE définit des exigences primordiales pour les méthodes de confirmation avec détection par spectrométrie de masse, en introduisant le concept de **points d'identification (IP)** et en définissant des critères pour les intensités ioniques. Au cours de l'analyse de confirmation, un nombre spécifique de IP doit être collecté. **Pour confirmer**



**l'identité univoque des substances non autorisées, illégales, ou interdites** - communément appelées substances du groupe A - un minimum de **4 IP** est requis.

Pour confirmer l'identité des substances vétérinaires autorisées répertoriées dans le groupe B, un minimum de 3 IP est requis. Le nombre d'IP gagnés par une analyse spécifique dépend de la technique utilisée et principalement de la spécificité des signaux générés par la technique analytique utilisée; Pour toutes ces raisons, la chromatographie couplée à la spectrométrie de masse est souvent préférée voire inévitable dans le cas des substances interdites. La confirmation de l'identité univoque des colorants est ainsi réalisée très souvent par LC-MS/MS, en détectant deux transitions dites MRM (Multiple Reaction Monitoring) par analyte. Elles sont nécessaires pour atteindre un haut degré d'identification. Cela se traduit par un nombre suffisant de IP, c'est-à-dire 5 IP pour la technique LC-MS/MS en référence au tableau 5 de la Décision 2002/657/CE. Ce nombre de IP devrait être inchangé dans la future réglementation SANTE-2018-11188. Lors de la sélection des transitions MRM, l'ion moléculaire (pseudo-moléculaire) doit être de préférence l'un des ions diagnostiques sélectionnés. Peuvent être retenus l'ion moléculaire, ses adduits caractéristiques, ses ions fragments caractéristiques et tous leurs isotopes).

De ce fait, il en découle un critère applicable basé sur l'intensité ionique relative. Les intensités relatives des ions détectés, par exemple en mode MRM, exprimées comme le pourcentage de l'intensité de l'ion le plus intense ou de la transition la plus intense, doivent correspondre à celles de l'analyte standard (soit en solution, soit dans des supplémentés, à des concentrations comparables), avec des tolérances indiquées dans la réglementation. Ces tolérances sont identiques pour les molécules autorisées ou non. Une **seule tolérance fixée à +/- 30 %** devrait

remplacer les quatre plages issues du tableau 4 de la Décision 2002/657/CE (Tolérances maximales admissibles pour les intensités ioniques relatives dans un ensemble de techniques de spectrométrie de masse). Ce nouveau seuil unique fixé à 30 % est cependant toujours en discussion car si l'on prend l'exemple de la détection de colorants à des concentrations inférieures à 0.1 µg/kg avec les instruments disponibles dans le commerce actuellement, il est certain que les intensités très faibles des ions à cette concentration subiront également une assez grande variabilité, et aboutiront à des intensités ioniques relatives hors seuil de tolérance. Il pourrait en résulter des cas d'échantillons non confirmés au seuil de tolérance de 30 % et donc jugés conformes à tort (échantillons faux négatifs).

↳ Les temps de rétention relatifs :

**Un temps de rétention (TR) relatif** correspond au temps de rétention de l'analyte comparé à celui du standard interne. Ce critère applicable à la séparation chromatographique repose sur l'écart en % entre le TR relatif de l'échantillon à analyser et le temps de rétention relatif moyen du standard de calibration analysé soit dans la matrice biologique d'intérêt, soit dans une solution aqueuse dite standard. Cet écart doit être inférieur à 2,5 % et devrait être remplacé selon le nouveau document SANTE 2018-11188 par une recommandation d'écart fixée à 1 %.

↳ Le Signal sur bruit (S/N) :

**Le S/N** est déterminé en examinant les chromatogrammes des **échantillons** dits blancs c'est-à-dire échantillons exempts de l'analyte concerné au temps de rétention de ce dernier ainsi que les chromatogrammes des **échantillons positifs** (nommés standards de validation lors de la validation). Ce critère mesuré comme le rapport du signal de l'analyte dans l'échantillon positif et dans l'échantillon blanc intervient pour évaluer **la spécificité** de l'analyse. La spécificité s'interprète comme la vérification que le signal mesuré provient uniquement de l'analyte. Elle est démontrée à partir de l'examen des chromatogrammes de solutions standards et de matrices blanches ; L'examen des matrices blanches et de la valeur du bruit de fond est d'ailleurs très importante dans le cas spécifique de la détection des colorants car ces derniers sont électrostatiques et peuvent engendrer des contaminations (verrerie, chaîne LC etc). Celles-ci apportent parfois un très faible bruit de fond qui pourra être interprété comme un signal (résultat faux positif). D'autant plus que la réglementation pour la déclaration de la présence avérée d'un signal stipule que le rapport **S/N pour chaque transition diagnostique doit être supérieure à un coefficient de 3.**

### 2.3.2 L'importance d'une quantification suffisamment exacte

#### ↳ La détermination de l'étalonnage et de la plage de linéarité

L'étalonnage aussi appelé calibration, est la base de la quantification des analytes dans un échantillon biologique. Il est, par conséquent, d'une grande importance pour l'obtention de résultats fidèles. La méthode de quantification la plus simple consiste à utiliser une courbe de calibration dite externe c'est-à-dire obtenue à partir d'une série de solutions standard croissantes en concentration de l'analyte dans un solvant. Ce principe est cependant rarement utilisé, car l'influence des effets de matrice sur le signal analytique peuvent alors conduire à des résultats peu fiables si l'on compare à des calibrants externes ne subissant pas ces mêmes effets.

La quantification par spectrométrie de masse de colorants dans des matrices biologiques complexes et variées se traite donc principalement par une procédure de **calibration réalisée dans la matrice**. Pour ce faire, la gamme d'étalons est préparée à partir d'échantillons simulés. Ceci permet de compenser les effets de matrices qui s'appliquent de façon uniforme à l'échantillon contrôlé comme à la gamme de calibration. Cette approche est parfaitement valable si la variation entre des échantillons d'origines différentes est faible; c'est généralement le cas pour des échantillons de la même espèce (exemple : crevettes), mais pas pour des échantillons d'espèces différentes en raison de compositions biochimiques différentes d'une espèce animale à une autre (teneurs en lipides, protéines, hydriques, ...). Par conséquent, la fiabilité de l'étalonnage repose sur l'utilisation d'un matériau représentatif de chaque type d'échantillon à contrôler (par exemple, saumon, truite, crevette), auquel différentes quantités connues de l'analyte sont ajoutées. Une courbe d'étalonnage est alors valable pour tous les échantillons de la même espèce animale.

Pour le dosage des résidus, les courbes de calibration doivent comprendre au minimum 5 points et il est préférable que ces points soient équidistants. La plage de calibration doit également être spécifiée. Elle est généralement peu étendue dans le cas des résidus et doit comprendre le calibrant « zéro » exempt d'analyte ; Par exemple une gamme proposée sur la plage de 0.5 à 2 µg/kg pour les colorants implique la série de calibration suivante : 0.0 / 0.5 / 1.0 / 1.5 / 2.0 / 2.5 µg/kg. Du fait de plages de calibration réduites entraînant peu d'hétéroscédasticité, le modèle de régression linéaire est très souvent adapté à l'usage.

### ↳ L'évaluation de la fidélité et de la justesse

La fidélité et la justesse d'une méthode d'analyse sont deux concepts liés se rapportant à la proximité entre la valeur de référence acceptée et le résultat du test (précision) ou la valeur moyenne d'une grande série de résultats de test (justesse); **l'exactitude inclut la justesse et la précision (ISO, 1994)**. La Décision 2002/657/CE définit en matière de précision et de justesse des exigences minimales auxquelles doivent satisfaire les méthodes quantitatives.

Le critère de précision, basé sur l'équation d'Horwitz, recommande une valeur limite de 30 % pour la reproductibilité inter-laboratoire des concentrations lorsqu'elles sont estimées en dessous de 10 µg/kg et une valeur limite de 15 à 20 % dans des conditions de répétabilité (1/2 à 2/3 de la reproductibilité inter-laboratoire) (Horwitz et al., 1980). Il est à noter que la précision est très souvent nettement améliorée lors de l'utilisation d'un standard interne marqué isotopique, souvent par le deutérium ou le C<sup>13</sup>. Ce n'est malheureusement pas le cas de tous les colorants car certains n'en possèdent pas et les résultats associés sont alors corrigés par un standard interne reposant sur un autre colorant analogue.

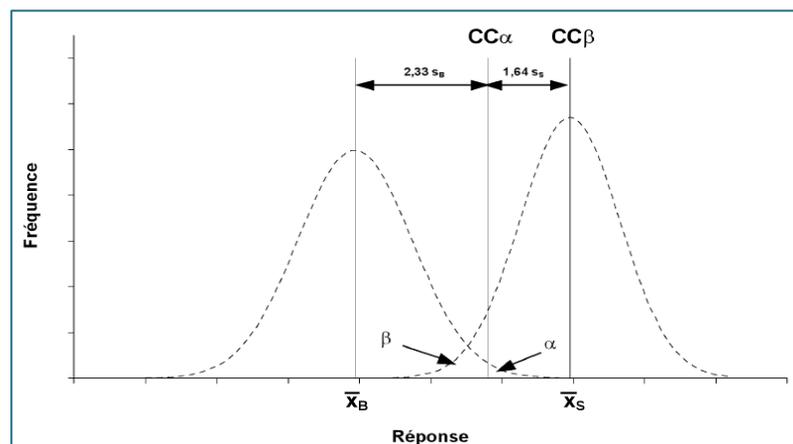
Les résultats de validation de la justesse obtenus à partir de matériaux de référence certifiés (MRC) sont considérés comme plus fiables que ceux obtenus à partir d'échantillons enrichis (ou supplémentés), et sont par conséquent recommandés. Dans le cas des colorants, il n'existe pas de MRC. La justesse de la méthode pour chaque colorant doit alors être évaluée à partir des expériences de validation reproduites sur des standards de validation, supplémentés dans la matrice et simulant ainsi des échantillons terrain. Pour des concentrations inférieures à 1 µg/kg par exemple, il est recommandé que la justesse de la mesure se situe entre -50 % et +20 % de la mesure vraie attendue. Des modifications devraient avoir lieu dans le nouveau règlement sur les plages d'acceptabilité au-delà de 1 µg/kg (**Tableau 8**)

**Tableau 8 : Justesse minimale des méthodes quantitatives**

| Fraction pondérale    | Plage d'acceptabilité 2002/657 | Plage d'acceptabilité proposée dans le futur règlement SANTE 2018-11188 |
|-----------------------|--------------------------------|---|
| ≤ 1 µg/kg             | -50 % to + 20 %                | -50 % to + 20 %   |
| > 1 µg/kg to 10 µg/kg | -30 % to + 10 %                | -30 % to + 20 %   |
| ≥ 10 µg/kg            | -20 % to + 10 %                | -20 % to + 20 %   |

### ↳ Le calcul des limites analytiques

La capacité de détection (**CC $\beta$** ) et la limite de décision (**CC $\alpha$** ) (**Figure 20**) sont deux limites analytiques ou encore appelées Concentrations Critiques qui ont remplacé les limites de détection et de quantification, respectivement. Le **CC $\alpha$**  est défini comme la limite statistique à partir de laquelle un échantillon est considéré non conforme au regard de la limite réglementaire imposée, avec une probabilité d'erreur  $\alpha$  fixée à 1 % pour les substances interdites ( $\alpha$  étant le risque de générer un faux résultat non conforme, c'est-à-dire la probabilité d'annoncer un résultat non-conforme alors qu'il est conforme, il est communément associé à un risque pour « l'éleveur » ou pour le « producteur » de l'aliment contrôlé). Le **CC $\alpha$**  constitue une limite cruciale pour les méthodes de confirmation. Ces 2 limites basées sur des lois statistiques (loi de Poisson ou loi de Gauss) présentent l'avantage d'inclure les **incertitudes de mesure** de l'analyse faites autour de la limite réglementaire de conformité. Elles suffisent à l'évaluation de l'incertitude de mesure dans les contrôles officiels. Une autre méthode consiste à estimer l'incertitude de mesure étendue à deux fois la reproductibilité intralaboratoire de la méthode analytique (JCGM, 2008). Le **CC $\beta$**  est défini comme la plus petite quantité de substance pouvant être détectée et / ou quantifiée dans un échantillon, avec une probabilité d'erreur  $\beta$  (risque de générer un résultat faux conforme qui est associé à un risque pour le « consommateur »), il est fixé à 1 % pour les substances interdites, 5 % pour les substances autorisées à LMR du groupe B. C'est une caractéristique importante pour définir la capacité des méthodes de dépistage.



**Figure 20 : Représentation graphique du **CC $\alpha$**  et du **CC $\beta$**  pour les substances non autorisées. Source : Décision 2002/657/CE**

Selon la Décision 2002/657 de la Commission Européenne, deux approches différentes peuvent être utilisées pour calculer le  $CC\alpha$  pour les substances interdites: la procédure basée sur la courbe d'étalonnage selon l'ISO 11843, procédure indiquée et appliquée dans le Guide interne de validation de notre laboratoire, et la procédure basée sur le signal recueilli dans la matrice témoin, c'est-à-dire exempte de contamination. Le  $CC\beta$  est alors estimé à partir de l'écart type analytique, obtenu au niveau du  $CC\alpha$  ( $CC\alpha + 2,33 s$ ). Par la procédure de la courbe d'étalonnage, les matrices témoin sont supplémentées à différentes concentrations autour du niveau de performance minimum requis (par exemple le RPA) et les signaux sont tracés en fonction de la concentration ajoutée; On calcule alors le  $CC\alpha$  comme la concentration obtenue par régression à l'ordonnée à l'origine plus 2,33 fois son écart-type, en supposant que la fonction d'étalonnage puisse être extrapolée linéairement jusqu'à l'axe des y. Cette hypothèse est parfois discutée, en particulier si le  $CC\alpha$  calculé est au final par extrapolation très inférieur à la concentration la plus faible dans l'étalonnage. Les différents modes de calculs sont actuellement en cours de discussion dans le cadre des évolutions réglementaires. Il devrait probablement apparaître une 3<sup>ème</sup> alternative, excluant toute extrapolation et basée sur la concentration la plus faible dans l'étalonnage, le LCL ou « Lowest Calibration Level ».

#### ↳ Des effets matrice maîtrisés

L'effet matrice correspond à la différence de réponse analytique entre un standard de la substance dissoute dans le solvant et un standard extrait de la matrice biologique (et souvent enrichi après extraction par reconcentration et nettoyage). Cet effet matrice est estimé soit sans correction à l'aide d'un standard interne (on parle d'effet de matrice absolu), soit avec correction à l'aide d'un standard externe (il est question alors d'effet matrice relatif). Il peut être évalué pendant le développement de la méthode ou bien lors de la validation, et estimé pour chaque espèce biologique. Le nouveau règlement stipule que l'effet matrice doit systématiquement être évalué sauf si une gamme de calibration réalisée directement dans la matrice est effectuée et/ou si une correction est appliquée au moyen d'un standard interne adapté.

#### ↳ La connaissance de la stabilité

La connaissance de la stabilité de l'analyte dans sa solution standard de stockage et dans la matrice de l'échantillon positif le contenant est une donnée essentielle. La stabilité de l'analyte dans un tissu biologique va dépendre des conditions de stockage (de même qu'en solution), de ses propriétés chimiques, de la matrice biologique et du récipient de stockage. La procédure d'évaluation de la stabilité doit en premier lieu comprendre une étude de l'analyte conservé dans

une solution standard dite solution mère, et stockée à  $-20^{\circ}\text{C}$  par exemple. Idéalement, l'étude de stabilité doit permettre d'évaluer le maintien des analytes aux différents stades du protocole d'analyse : au cours du prélèvement et de la manipulation des échantillons, après un stockage à long terme (congelé à la température de stockage prévue, très souvent  $-20^{\circ}\text{C}$ ), après un stockage à court terme (sur une paille, à la température ambiante), et après des cycles de congélation et de décongélation s'il est prévu de manipuler l'échantillon à plusieurs reprises. Les conditions utilisées dans les expériences de stabilité doivent refléter les situations susceptibles de se produire lors de la manipulation et de l'analyse des échantillons.

La stabilité de la méthode, de même que la robustesse, sont des caractéristiques de la méthode qui sont systématiquement abordées pour partie tout au long du développement analytique. Mais elles ne font généralement pas l'objet d'un projet de validation en tant que tel. Nous avons néanmoins envisagé qu'une étude de stabilité plus poussée soit réalisée si la méthode d'analyse multi-familles de colorants doit être retenue comme méthode officielle dans le futur.