

Dispositif de surveillance des promoteurs de croissance

Stéphanie Prévost¹, Ludivine Sérée¹, Parina Sittisack¹, Gaud Dervilly-Pinel¹, Bruno Le Bizec¹,
Isabelle Fournet²

*Auteur correspondant : stephanie.prevost@oniris-nantes.fr

- ¹ Oniris, Laboratoire d'étude des résidus et contaminants dans les aliments (Laberca), Laboratoire national de référence pour les promoteurs de croissance et contaminants environnementaux organiques, Lunam Université, Nantes, France
- ² Direction générale de l'Alimentation, Service des actions sanitaires en production primaire, Sous-direction de la santé et de la protection animales, Bureau des intrants et de la santé publique en élevage, Paris, France.

Résumé

L'utilisation des promoteurs de croissance est interdite en élevage au sein de l'Union européenne depuis 1988. Afin de garantir au consommateur des denrées exemptes de résidus de ce type de substances, un dispositif européen de surveillance et de contrôle accompagne cette mesure, qui en France est organisé depuis 1988 dans le cadre des plans de surveillance et de contrôle mis en place par la direction générale de l'Alimentation. Le présent article décrit le cadre réglementaire, les modalités de mise en œuvre en termes de composés d'intérêt, d'espèces animales concernées, de matrices biologiques pertinentes et de stratégies analytiques adaptées. Les données issues des plans 2014 illustrent l'ensemble du dispositif.

Mots clés : Promoteurs de croissances, plan de surveillance, spectrométrie de masse

Les promoteurs ou facteurs de croissance se définissent comme des substances anabolisantes permettant d'accroître la masse musculaire, à des fins d'amélioration de performance physique et/ou économique. De tout temps, l'Homme a cherché à améliorer ses performances par des moyens artificiels. Et les premières notions de dopage datent de l'Antiquité (L'Iliade et l'Odyssée). Dès le VI^e siècle avant J.-C., les athlètes grecs ingéraient déjà des viandes variées selon la discipline sportive qu'ils exerçaient : les sauteurs mangeaient de la viande de chèvre, les boxeurs et les lanceurs, de la viande de taureau, les lutteurs quant à eux préféraient de la viande grasse de porc.

La notion de dopage en élevage est bien plus récente et les premiers scandales sur son utilisation apparaissent au XX^e siècle. Les stimulants de croissance ou leurs dérivés synthétiques sont alors utilisés pour améliorer la conversion alimentaire des animaux et ainsi leur croissance. Par ce traitement, les animaux se développent plus vite, avec la même quantité d'aliment.

Dans un premier temps, des hormones synthétiques bon marché, tel le diéthylstilbestrol (DES) alors utilisé en médecine humaine ont été administrés aux animaux. Après les différents scandales et les réactions très vives des consommateurs en raison des risques sanitaires associés, ce sont des hormones naturelles qui ont été utilisées :

- des hormones sexuelles (testostérone, oestradiol, progestérone),
- des hormones stéroïdiennes de synthèse (acétate de trenbolone),
- des antithyroïdiens de synthèse (thiouracile),
- des β -agonistes analogues de l'adrénaline (agonistes β 2-adrenergiques) (clenbutérol),
- l'hormone de croissance hypophysaire (somatotropine).

Les concentrations utilisées étant très faibles et ne conduisant pas à des résidus en quantité supérieure à celles d'animaux non traités dans le cas des hormones naturelles, le débat s'est alors focalisé sur les questions éthiques. Cependant, les résidus restent toujours l'objet de rapports très controversés, les partisans prouvant l'innocuité des traitements et les adversaires arguant que les données sont insuffisantes.

Les producteurs aux Etats-Unis, au Canada et dans d'autres pays utilisent ces stimulants pour trois raisons principales : améliorer la qualité de la viande (en effet, les animaux produisent plus de viande maigre au détriment du gras), améliorer l'efficacité de l'alimentation (on obtient ainsi un poids supérieur avec moins d'aliments), réduire les coûts de production (le prix de la viande est réduit car une quantité supérieure de viande est produite avec des coûts de production inférieurs).

Au sein de l'Union européenne, l'utilisation des promoteurs de croissance en élevage est régie par un cadre réglementaire, dont l'application est surveillée grâce à un dispositif de contrôle harmonisé au niveau européen. Celui-ci consiste en une détection et identification d'éventuels résidus de ces substances ou de leurs marqueurs dans des matrices animales ou d'origine animale.

RÉFÉRENCES RÉGLEMENTAIRES

L'utilisation de stéroïdes et thyrostatiques, est prohibée en élevage depuis 1988 (directive 88/146/CEE). Cette législation a évolué au fil des années et s'est traduite en 1996 par un dispositif réglementaire qui encadre l'utilisation en élevage des substances à effet hormonal

(œstrogènes, androgènes, progestagènes), ou thyrostatique, ainsi que les substances β -agonistes (directive 96/22/EC, modifiée par les directives 2003/74/EC et 2008/97/EC). Les substances interdites y sont listées en Annexe II. Il est toutefois prévu que certains États membres puissent déroger à l'interdiction de ces substances pour quelques indications thérapeutiques ou zootechniques, sous réserve que ces substances entrent dans la composition de médicaments vétérinaires ayant reçu une autorisation de mise sur le marché (AMM) et que les contrôles analytiques de recherche de résidus correspondants soient disponibles.

L'utilisation de l'hormone de croissance est, quant à elle, interdite en Europe depuis 1990 (décision 1990/218/CEE) suivie d'un moratoire (décision 1994/936/CE) prolongé depuis 1999 par la décision 1999/879/EC.

Les premiers contrôles de l'utilisation frauduleuse de ces substances sont cadrés par la directive 85/358/CEE. Cette législation évolue en parallèle de la législation sur l'utilisation des promoteurs de croissance et se traduit en 1996 par la directive 96/23/EC qui outre le contrôle de l'utilisation frauduleuse de promoteurs de croissance, englobe et harmonise la surveillance et le contrôle de tous les types de résidus chimiques dans les denrées alimentaires d'origine animale dont le danger pour la santé humaine est avéré ou potentiel (résidus de médicaments vétérinaires et contaminants environnementaux). Elle met en avant l'obligation de désignation des laboratoires nationaux de référence et leur rôle fondamental dans l'animation des réseaux de laboratoire pour la réalisation des analyses officielles. Elle est complétée par :

- la décision 97/747/CE qui fixe le niveau et la fréquence d'échantillonnage pour certaines filières,
- la décision 98/179/CE qui fixe les modalités d'échantillonnage officiel,
- la décision 2002/657/CE qui porte modalité d'application de la directive 96/23 en ce qui concerne les performances des méthodes d'analyse et l'interprétation des résultats.

Les directives européennes sont transposées en droit national pour devenir effectives dans chaque État membre. En France, les articles R 234-1 à R 234-14 du Code rural et de la pêche maritime (CRPM) reprennent pour partie ces directives relatives aux promoteurs de croissance

LES PLANS DE CONTROLE MIS EN ŒUVRE EN 2014 (tableau 1)

La directive 96/23/CE, complétée de la décision 97/747/CE, cadre la stratégie, le niveau et la fréquence d'échantillonnage pour les huit plans de contrôle à mettre en œuvre chaque année en production primaire pour la recherche des promoteurs de croissance dans les filières suivantes :

- bovine, porcine, volaille au niveau des élevages et abattoirs,
- ovine/capraine, équine, lapin, gibier d'élevage au niveau des abattoirs,
- poissons d'élevage, au niveau des élevages ou à la première transformation,

Les prélèvements sont ciblés et inopiné. Les critères de ciblage peuvent être liés au type de production ou toute autre information dont disposent les DDecPP. Les groupes de promoteurs de croissance recherchés annuellement dans le cadre de ces plans de contrôle sont conformément à la directive 96/23 : les stilbènes et dérivés de stilbènes (groupe A1), les antithyroïdiens de synthèse (groupe A2), les stéroïdes (groupe A3), les lactones de l'acide résorcylique (groupe A4) et les β -agonistes (groupe A5). Soulignons que la recherche des corticostéroïdes (Groupe B2f) est traditionnellement associée à celle des promoteurs de croissance, car historiquement, en Europe, ils ont été retrouvés dans le cadre d'investigations liées à des mésusages de β -agonistes et/ou aux stéroïdes.

Hors obligations réglementaires, la France a choisi de contrôler également la présence d'hormones de croissance chez les bovins et les poissons.

Le choix des matrices prélevées a été défini selon leur pertinence en termes soit de moyen d'administration possible (alimentation) soit de matrice concentrant le mieux les résidus trace d'administration.

Tableau 1. Plans de contrôle des promoteurs de croissance dans les matrices animales pour 2014

Filière	Groupe de promoteurs	Alimentation animale	Sang	Urine	Poil	Poumon	Oeil	Thyroïde	Muscle ou foie
BOVINS	Stilbènes	X		X	X				X
	Anti-thyroïdiens	X		X				X	
	Stéroïdes	X		X	X				X
	Esters de stéroïdes				X				
	Acide résorcylique	X		X	X				X
	β -agonistes	X		X	X	X	X		
	Glucocorticoïdes				X				X
	Somatotropine bovine recombinée		X						
PORCINS	Stilbènes	X		X					X
	Anti-thyroïdiens	X		X					
	Stéroïdes	X		X					X
	Esters de stéroïdes				X				
	Acide résorcylique	X		X					X
	β -agonistes	X				X	X		
	Glucocorticoïdes				X				X

OVINS CAPRINS ÉQUINS	Stilbènes			X					
	Antithyroïdiens			X					
	Stéroïdes			X					
	Acide résorcylique			X					
	β-agonistes					X			
	Glucocorticoïdes				X				X
VOLAILLE	Stilbènes	X							X
	Stéroïdes	X							X
	Acide résorcylique	X							X
	β-agonistes	X				X			
LAPIN GIBIER	Stilbènes								X
	Stéroïdes								X
	Acide résorcylique								X
	β-agonistes					X			
POISSON	Stilbènes								X
	Stéroïdes								X
	Acide résorcylique								X
	somatotropine		X						

ÉCHANTILLONNAGE ET RÉPARTITION DES PRÉLÈVEMENTS EN 2014

Le nombre de prélèvements à réaliser par filière et par lieu de prélèvement (élevage ou abattoir) pour les plans de contrôle des promoteurs de croissance a été calculé (Tableau 2)

1- pour répondre aux dispositions de la directive 96/23/CE soit au prorata :

- du nombre d'animaux abattus pour les animaux de boucherie et le gros gibier ;
- du tonnage abattu pour la volaille, le petit gibier et le lagomorphe ;
- du tonnage de production pour les poissons d'élevage.

2- pour répondre à une priorisation fonction du nombre de non conformités relevées les années précédentes

Tableau 2. Nombre de prélèvements à réaliser par filière et lieu de prélèvement

	Population cible 2014	Taille de l'échantillon national minimal annuel imposé par la réglementation pour la recherche des promoteurs de croissance et autres substances interdites (groupe A)		Taille minimale de l'échantillon national par sous-groupe			Solde à répartir en fonction de la priorisation de l'Etat membre	Programmation DGAL 2014			
								Elevage	Abattoir	Total	
Bovins	4 775 000 (nombre total de bovins abattus sur 12 mois)	0,25 % de la production dont la moitié en élevage	11 937 échantillons dont 6 000 en élevage	A1	Stilbènes	5 %	597	8 356	2 100	2 100	4 200
				A3	Stéroïdes (+esters)	5 %	597				
				A4	Acides résorcyliques	5 %	597				
				A2	Anti-thyroïdiens	5 %	597				
				A5	β-agonistes	5 %	597				
				A6	Substances incluses dans 37/2010 - Tableau 2	5 %	597				
		Abs	Abs	B2f	Glucocorticoides	Abs	Abs			600	600
					Somatotropine	Abs	Abs				
TOTAL PROMOTEURS BOVINS											9 400
Porcins	23 933 000 (nombre total de porcins abattus sur 12 mois)	0,02 % de la production avec un minimum de 0,001 % en élevage	4 787 échantillons (têtes différentes) dont 239 en élevage	A1	Stilbènes	5 %	239	3 351	130	190	320
				A3	Stéroïdes (+esters)	5 %	239				
				A4	Acides résorcyliques	5 %	239				
				A2	Anti-thyroïdiens	5 %	239				
				A5	β-agonistes	5 %	239				
				A6	Substances incluses dans 37/2010 - Tableau 2	5 %	239				
		Abs	Abs	B2f	Glucocorticoides	Abs	Abs			200	200
					TOTAL PROMOTEURS PORCINS						
Petits ruminants	4 472 000 (nombre total d'ovins- caprins abattus sur 12 mois)	0,01 % de la production	447 échantillons	A1	Stilbènes	5 %	22	313		100	100
				A3	Stéroïdes	5 %	22				
				A4	Acides résorcyliques	5 %	22				
				A2	antithyroïdiens	5 %	22				
				A5	β-agonistes	5 %	22				
				A6	Substances incluses dans 37/2010 - Tableau 2	5 %	22				
		Abs	Abs	B2f	Glucocorticoides	Abs	Abs			140	140
					TOTAL PROMOTEURS PETITS RUMINANTS						
Equins	19 000 (nombre	Pas de minimum		A1	Stilbènes	Abs	Abs		4	4	4
				A3	Stéroïdes	Abs	Abs				

	total d' équins abattus sur 12 mois)	imposé mais obligation de chercher les substances du groupe A		A4	Acides résorcyliques	Abs	Abs				
				A2	Anti-thyroïdiens	Abs	Abs		4	4	4
				A5	β-agonistes	Abs	Abs		4	4	4
				A6	Substances incluses dans 37/2010 - Tableau 2	Abs	Abs		4	4	4
				B2f	Glucocorticoides	Abs	Abs		4	4	4
TOTAL PROMOTEURS EQUINS											16
Volailles	1 703 000 tonnes abattues sur 12 mois	0,25 % du tonnage abattu avec un minimum de 0,05 % en élevage	4269 échantillons (lots différents)	A1	Stilbènes	5 %	213	3204	68	247	315
				A3	Stéroïdes	5 %	213				
				A4	Acides résorcyliques	5 %	213				
				A5	β-agonistes	5 %	213		187	695	882
				A6	Substances incluses dans 37/2010 - Tableau 2	5 %	213		616	2444	3060
TOTAL PROMOTEURS VOLAILLES											1 197
Lapins	46 000 tonnes abattues sur 12 mois	30 prélèvements + 0,1 % du « tonnage abattu -3000t »	73 échantillons (lots différents)	A1	Stilbènes	30 %	22		5		5
				A3	Stéroïdes						
				A4	Acides résorcyliques						
				A5	β-agonistes	70 %	51		10	10	
				A6	Substances incluses dans 37/2010 - Tableau 2				60	60	
TOTAL PROMOTEURS LAPINS											15
Gibier d'élevage	3 000 têtes gros gibier 9 000 tonnes petits gibiers abattus sur 12 mois	20 prélèvements	20 échantillons (lots différents)	A1	Stilbènes	Abs	Abs		4		4
				A3	Stéroïdes	Abs	Abs				
				A4	Acides résorcyliques	Abs	Abs				
				A5	β-agonistes	Abs	Abs		4	4	
				A6	Substances incluses dans 37/2010 - Tableau 2	Abs	Abs		28	28	
TOTAL PROMOTEURS GIBIER											8
Poissons élevage	50 000 tonnes abattues sur 12 mois	0,333 %	165 échantillons (lots différents)	A1	Stilbènes	Abs	Abs		50		50
				A3	Stéroïdes	Abs	Abs				
				A4	Acides résorcyliques	Abs	Abs				

				A6	Substances incluses dans 37/2010 - Tableau 2	Abs	Abs			120	120
				B2f	Somatotropine	Abs	Abs			50	50
TOTAL PROMOTEURS POISSONS										100	
TOTAL PROMOTEURS TOUTES FILIERES										12 106	

La répartition régionale de ces prélèvements a été faite au prorata des volumes d'élevage pour les prélèvements en élevage et au prorata des volumes d'abattage pour les prélèvements en abattoirs tel qu'illustré en Figure 1.

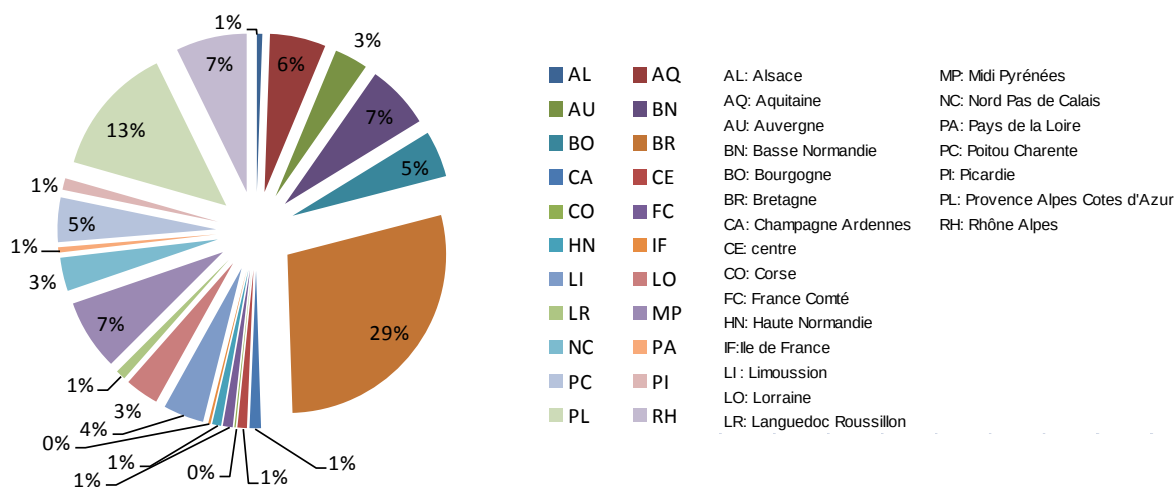


Figure 1. Répartition régionale des prélèvements réalisés pour le groupe de substances A1 à A5 et B2f

PROMOTEURS DE CROISSANCE RECHERCHÉS ET MÉTHODES D'ANALYSE

La directive 96/23/EC impose aux États membres le développement de méthodes analytiques fiables pour le contrôle de l'utilisation frauduleuse de facteurs de croissance en élevage, sous la coordination des laboratoires de référence de l'Union européenne (EU-RL) désignés par la Commission européenne. Le RIKILT (Wageningen, Pays-Bas) est l'EU-RL pour les promoteurs de croissance présentant une activité hormonale et le BVL (Berlin, Allemagne) est l'EU-RL pour les substances de type β -agonistes. Les missions de ces laboratoires sont de contribuer à l'évolution des méthodes analytiques, leur validation et l'harmonisation des performances sur le territoire européen.

Outre les familles listées dans l'annexe I de la directive 96/23/EC, d'autres substances non réglementées peuvent faire l'objet de surveillance sur la base d'informations issues de la Brigade nationale d'enquêtes vétérinaires et phytosanitaires ou du laboratoire national de référence. C'est le cas des SARMS (Selective Androgen Receptor Modulators). Ces substances sont aujourd'hui recherchées dans le cadre d'un plan exploratoire.

Les méthodes officielles permettent aujourd'hui la détection et l'identification d'environ 70 promoteurs de croissance. L'analyse de première intention réalisée sur un échantillon, dite de dépistage, doit être rapide, facile à mettre en œuvre, peu onéreuse, sensible et robuste. Ces méthodes présentent une grande capacité de traitement et sont appliquées par les onze laboratoires du réseau « Promoteurs de Croissance » répartis sur le territoire, pour passer au crible de nombreux échantillons en vue de distinguer rapidement les échantillons « conformes » des « suspects ». Un échantillon est déclaré suspect lorsqu'à l'issue du dépistage, l'identité du composé est affirmée et, le cas échéant, lorsque la molécule est soumise à une limite maximale résiduelle, sa concentration excède ce seuil. Cette première étape doit permettre la sélection d'échantillons suspects qui devront ensuite être diagnostiqués conformes ou non par une méthode de confirmation. L'échantillon est alors ré-extrait pour vérifier qu'il ne s'agit pas d'un faux diagnostic (contamination, inversion d'échantillon,...). La non-conformité est prononcée lorsque la concentration du composé identifié est supérieure au seuil de décision ou CC α . Les performances des méthodes ainsi développées doivent satisfaire, pour l'étape de dépistage une proportion de résultats faux-conformes (faux négatifs) inférieure à 5 % et pour l'étape de confirmation une proportion de résultats faux non-conformes (faux positifs) inférieure à 1 %. Les exigences relatives aux performances des méthodes ainsi qu'à l'interprétation des résultats sont décrits dans la décision 2002/657/EC.

Si les méthodes de dépistage peuvent reposer sur différentes techniques analytiques (immuno-essais, spectrométrie de masse,...), les méthodes de confirmation impliquent quant à elles, l'analyse ciblée du composé administré et/ou de ses métabolites directs par chromatographie couplée à une détection par spectrométrie de masse pour une identification non ambiguë de l'analyte d'intérêt et sa quantification

✓Méthodes de dépistage

Les analyses officielles de dépistage sont conduites par le réseau des laboratoires de première intention agréés par la direction générale de l'Alimentation. Ces structures disposent de méthodes multi-résidus officielles, développées et validées par le LNR, selon la décision 2002/657/CE. Ces méthodes permettent la recherche de promoteurs de croissances sur des matrices biologiques complexes comme les urines, les phanères (par ex. poil) ou d'autres matrices retenues en fonction de leur pertinence. La rétine est par exemple une matrice biologique intéressante, car elle fixe durablement les résidus de agonistes β 2-adrénergiques et permet la démonstration de la fraude, longtemps après l'administration de la substance. Elle est privilégiée en abattoir. Le poil possède lui aussi cette propension à fixer les résidus de stéroïdes ou de β -agonistes allongeant ainsi la fenêtre de la détection. Cette matrice est retenue à la fois en élevage et en abattoir. Il existe ainsi plusieurs couples matrices/molécules qui augmentent l'efficacité du contrôle (par ex. β -agonistes/poumon ou rétine, stéroïdes/fèces, progestagènes/tissu adipeux, thyrostatiques/thyroïde,...).

La nature des extraits biologiques, souvent complexe, nécessite généralement plusieurs étapes d'extraction et de purification avant caractérisation de leur contenu. Les méthodes de mesure

doivent combiner sélectivité et sensibilité, car les résidus de ces substances sont présents le plus souvent à l'état d'ultra-traces (ng.kg⁻¹ au pg.kg⁻¹). Parmi les méthodes les plus utilisées aujourd'hui, on retrouve la chromatographie couplée à la spectrométrie de masse. Il peut s'agir de chromatographie en phase gazeuse pour les petites molécules thermostables et volatiles (stéroïdes, stilbènes, lactones de l'acide résorcylique) ou de la chromatographie en phase liquide pour les autres (β -agonistes, thyrostatiques, somatotropine, corticostéroïdes). Pour une spécificité accrue de la détection, la spectrométrie de masse est systématiquement de type multidimensionnelle (MS/MS), elle peut être parfois de type haute résolution (HRMS).

✓ Méthodes de confirmation

Une analyse de confirmation peut être mise en œuvre lorsque, à l'issue de l'analyse de dépistage, le laboratoire du réseau a suspecté la présence d'un des composés recherchés. La stratégie de confirmation et la technique d'analyse mise en œuvre sont définies spécifiquement en fonction de la nature de l'analyte suspecté et de sa concentration. On distingue pour cela deux sous groupes de substances parmi les promoteurs de croissance : les substances dites xénobiotiques pour lesquelles la seule détection signe sans ambiguïté une utilisation frauduleuse chez l'animal de substances chimiques et les substances de nature endogène (par ex. estradiol, testostérone...) pour lesquelles la détection n'implique pas forcément la non-conformité de l'échantillon. En effet, les stéroïdes androgéniques (testostérone, nandrolone, boldénone) et estrogéniques (estradiol) peuvent être détectés à des concentrations très variables en fonction de l'âge, du sexe et de l'état physiologique de l'animal. Dans le cas de la testostérone et de l'estradiol, la mesure de la composition isotopique en carbone ¹³C/¹²C par spectrométrie de masse de rapport isotopique (GC-C-IRMS) permet de distinguer le caractère endogène ou exogène des résidus, notamment dans l'urine de l'animal. Le poil peut être aussi utilisé pour ce type de composés, car les résidus des formes esters de stéroïdes administrés peuvent s'y fixer, ce qui démontre sans contestation l'usage de la dite substance, l'organisme de l'animal ne produisant pas ce type de dérivé (par ex. boldénone undécylénate, nandrolone cypionate,...). La présence de certaines substances peut également être attribuée à l'alimentation de l'animal. Il s'agit notamment du zéranol (groupe A4) ou encore du thiouracile (groupe A2) qui peuvent être respectivement la conséquence d'un aliment contaminé par une mycotoxine (la zéaralénone) ou encore une alimentation enrichie en brassicacées (Pinel *et al.*, 2006). Pour toutes ces situations délicates, le LNR se charge des confirmations et des interprétations.

RÉSULTATS - BILAN 2014

A l'issue de l'étape de dépistage, réalisée sur l'ensemble des prélèvements, les analyses mises en œuvre dans le cadre de confirmations ont majoritairement concerné les composés considérés comme potentiellement endogènes tels la boldénone, la nandrolone, l'estradiol, la testostérone, le zéranol, le taléranol et qualifiés d'hormones naturelles, mais aussi des composés strictement xénobiotiques tels les β -agonistes, les esters de stéroïdes (A1 et A3). La ventilation des analyses

de confirmation en fonction du groupe de substances d'intérêt pour l'année 2014, est représentée dans la Figure 2.

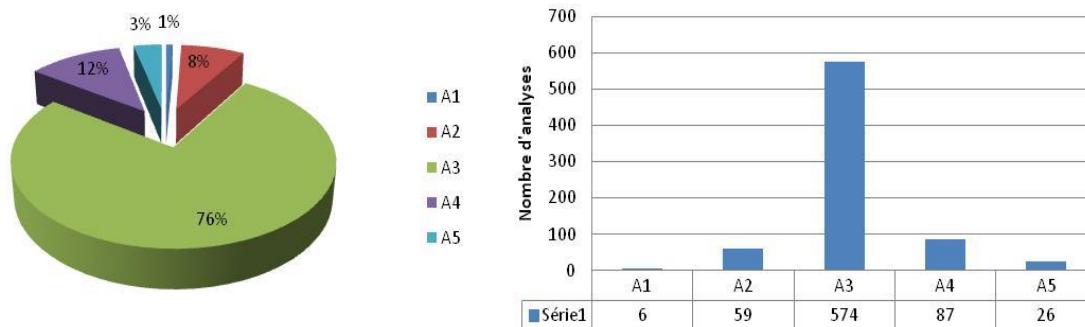


Figure 2. Répartition du nombre d'analyses de confirmation réalisées selon le groupe de substances

Les non-conformités observées concernent d'une part des dépassements de la LMR pour la dexaméthasone dans la matrice foie pour le groupe de substances B2f, d'autre part la présence de thiouracile identifiée dans des urines à des concentrations variables et supérieures à 10 µg.L⁻¹ pour deux prélèvements. Ces concentrations en thiouracile ne sont toutefois pas incompatibles avec une alimentation enrichie en brassicacées (Pinel *et al.* 2006).

Au niveau européen, il convient de souligner que la majorité des Etats membres réalise le nombre minimum de prélèvements imposés par la directive 96/23 EC et la décision 97/747 EC. Les matrices prélevées sont globalement similaires entre les Etats membres, ainsi les prélèvements d'urine, de tissu, de phanère et d'aliments sont majoritairement représentés pour la recherche des promoteurs de croissance.

La tendance depuis 2013 semble être une augmentation des non-conformités déclarées par les Etats membres, le rapport de l'European Food Safety Authority (Report for 2014 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products, 25 May 2016) indique cependant que les substances mises en évidence ne sont pas systématiquement attribuées à une utilisation illégale, mais plutôt le résultat de déclarations relatives aux hormones naturelles, notamment pour le groupe de substances A3 correspondant aux stéroïdes et pour lesquels les non-conformités représentent 0,08 % des mesures associées à ce groupe de composés. En effet certains des composés mis en évidence peuvent être rencontrés chez les espèces concernées de manière endogène sans qu'il y ait eu un traitement illégal. Il s'agit par exemple de la boldénone (forme α et β), la 17 α -nandrolone et la 17 α -testostérone. Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que les Etats membres ne disposent toujours pas de méthodes et/ou techniques de confirmation spécifiques et adaptées dans le cas particulier des hormones naturelles. En ce qui concerne les agents thyroïdiens (groupe A2), 0,59 % des échantillons analysés ont été reportés non conformes et

concernent exclusivement le thiouracile. Le groupe B2f est également représenté au niveau européen par 28 prélèvements non conformes reportés.

CONCLUSION - PERSPECTIVES

Le contrôle de l'usage des promoteurs de croissance est aujourd'hui assuré par un maillage de compétences associant :

- les DDecPP qui assurent le ciblage des prélèvements,
- le réseau des laboratoires officiels qui mettent en œuvre des méthodes de dépistage permettant la recherche d'environ 70 composés différents, appartenant aux différents groupes connus de promoteurs de croissance,
- le LNR qui développe et met en œuvre des méthodes de confirmation performantes et spécifiques.

Les principaux freins à un contrôle encore plus efficace de l'utilisation des promoteurs de croissance sont aujourd'hui de trois types :

- la difficulté de prélèvement de certaines matrices sur les animaux cibles,
- la détection des substances naturelles douées de propriétés anabolisantes,
- la mise en évidence de molécules inconnues.

Dans le premier cas, le frein est de taille car si cette difficulté de prélèvement n'est pas prise en considération, il reste très peu probable que le ciblage et ainsi la détection de pratiques frauduleuses puisse être identifiée quelle que soit la méthode utilisée et sa performance. Un plan expérimental de prélèvement de fèces a été mis en place afin d'évaluer l'intérêt scientifique de cette matrice pour la recherche des substances stéroïdiennes et envisager la collecte des fèces plutôt que des urines, difficiles à prélever chez les animaux cibles.

Dans le deuxième cas, et en accord avec une convention établie entre la DGAL et le Laberca, des méthodes analytiques spécifiques ont été développées récemment. Elles reposent sur l'utilisation de la spectrométrie de masse de rapport isotopique qui permet de mesurer avec une grande précision le rapport carbone 12/carbone 13 dans une molécule, proportion qui diffère selon que la molécule soit endogène ou de synthèse (Buisson *et al.*, 2005; Janssens *et al.*, 2015). Cette stratégie n'est cependant présente que dans un nombre restreint d'Etats membres (trois laboratoires). Des stratégies alternatives et plus abordables pour l'ensemble des États membres sont également investiguées et reposent notamment sur la combinaison de couples matrice/résidus pertinents, par exemple sang/esters de stéroïdes ou poils/esters de stéroïdes (Kaabia *et al.* 2013).

En ce qui concerne la détection de composés inconnus, ou plus largement de manipulations physiologiques frauduleuses, des approches d'exploration globale du fonctionnement de l'organisme, investiguées au cours de la dernière décennie, ont d'ores et déjà fait leurs preuves.

Ces stratégies ne cherchent pas à identifier directement la présence de molécules suspectées ou de leurs métabolites directs, mais à révéler une signature métabolique ou physiologique spécifique pouvant être associée à une pratique anabolisante. Ces approches dites « indirectes » ou « non ciblées » (Nebbia *et al.*, 2011; Pinel *et al.*, 2010) reposent sur des méthodes telles la transcriptomique (Riedmaier, 2015; Riedmaier *et al.*, 2009a; Riedmaier *et al.*, 2012; Riedmaier and Pfaffl, 2013; Riedmaier *et al.*, 2009b, c), la protéomique (Cacciatore *et al.*, 2009; Cunningham *et al.*, 2009; Kinkead *et al.*, 2015) ou la métabolomique (Dervilly-Pinel *et al.*, 2015a; Dervilly-Pinel *et al.*, 2012; Gallart Ayala *et al.*, 2015; Jacob *et al.*, 2014; Kouassi Nzoughet *et al.*, 2015b), incluant ses déclinaisons que sont la lipidomique (Kouassi Nzoughet *et al.*, 2015a) et la stéroïdomique (Dervilly-Pinel *et al.*, 2011; Kaabia *et al.*, 2014). Ces nouvelles approches permettent ainsi de découvrir des marqueurs moléculaires d'effets, qui peuvent ensuite faire l'objet d'un suivi ciblé dans un contexte de dépistage de pratiques anabolisantes. Un tout premier exemple de suivi de biomarqueurs identifiés via une approche métabolomique (Dervilly-Pinel *et al.*, 2015a) et dédié au dépistage de l'utilisation de composés β -agonistes chez le veau est ainsi mis en œuvre depuis 2013 en France pour le contrôle officiel (Dervilly-Pinel *et al.*, 2015b). Il s'agit d'une première mondiale en la matière.

Ces évolutions récentes pourraient s'avérer efficaces pour augmenter la pression de contrôle et *in fine* permettre la détection d'un panel élargi et réaliste de pratiques anabolisantes.

De plus, et en ce qui concerne l'évolution du contexte réglementaire, il est attendu que la réglementation européenne en matière de contrôle de l'usage des facteurs de croissance intègre de nouveaux paramètres pouvant être utilisés pour organiser encore plus efficacement les plans de contrôle, en l'occurrence l'intégration des progrès techniques relatifs à la détection mais aussi les nouveaux usages ou substances à activité hormonale.

Dans ce contexte, une révision de la décision 2002/657 relative « aux performances des méthodes ainsi qu'à l'interprétation des résultats » est actuellement en discussion au niveau européen afin de prendre en compte les innovations et connaissances nouvelles générées depuis sa parution.

Il est également attendu que les évolutions tiennent compte des possibilités d'harmonisation des procédures mises en œuvre dans les différents États membres afin de garantir l'homogénéité des pratiques et décisions, pour une qualité accrue du contrôle. Ainsi, si la décision 2002/657/EC a défini le concept de LMPR (limite minimale de performance requise), qui correspond à une concentration fixée que tout laboratoire de contrôle doit être capable d'atteindre dans le cadre de dépistage et de confirmation, seules quelques valeurs ont à ce jour été publiées (par ex. LMPR pour l'acétate de médroxyprogestérone).

Le règlement 470/2009/EC indique la possibilité de fixer des RPA (Reference Point for Action) pour les substances non autorisées et pharmacologiquement actives, lorsque nécessaire pour assurer le contrôle des denrées d'origine animale importées ou mises sur le marché. Les RPA sont définies comme des limites d'action combinant dans leur construction, à la fois des possibilités analytiques raisonnables que les laboratoires officiels peuvent supporter, et

compatibles avec des niveaux résiduels qui ne présentent pas de risque pour la santé du consommateur. Les denrées contenant des résidus de substances à une concentration supérieure ou égale à la RPA sont alors considérées comme impropres à la consommation. Si la concentration est inférieure à cette limite, la non-conformité est à enregistrer mais ne nécessite pas de mesures de gestion sur la denrée. Les perspectives en la matière sont ainsi de considérer les aspects analytiques et toxicologiques pour la fixation de ces valeurs, sans pour autant que cela ne remplace un processus complet d'évaluation du risque associé (EFSA 2013).

Références bibliographiques

Bilan 2014 de la surveillance sanitaire des denrées animales et végétales (plans de surveillance et de contrôle) – DGAL.

Buisson, C., Hebestreit, M., Weigert, A.P., Heinrich, K., Fry, H., Flenker, U., Banneke, S., Prevost, S., Andre, F., Schaenzer, W., Houghton, E., Le Bizec, B., 2005. Application of stable carbon isotope analysis to the detection of 17beta-estradiol administration to cattle. *J Chromato. A* 1093, 69-80.

Cacciatore, G., Eisenberg, S.W., Situ, C., Mooney, M.H., Delahaut, P., Klarenbeek, S., Huet, A.C., Bergwerff, A.A., Elliott, C.T., 2009. Effect of growth-promoting 17beta-estradiol, 19-nortestosterone and dexamethasone on circulating levels of nine potential biomarker candidates in veal calves. *Anal Chim Acta* 637, 351-359.

Council Decision 1999/879/EC, 1999. Council Decision 1999/879/EC of 17 December 1999 concerning the placing on the market and administration of bovine somatotrophin (BST) and repealing Decision 90/218/EEC. . *Off J Eur Commun L* 331: 71-72.

Council Decision 2002/657/EC, 2002. Council Decision 2002/657/EC implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, . *Off J Eur Union*.

Council Directive 96/23/EU, 1996. Council Directive 96/23/EU on measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products *Off. J. Eur. Union L*125,. *Off J Eur Union* 96/23/EC.

Council Directive 96/22/EC, 1996. Council Directive 96/22/EC of 29 April 1996 concerning the prohibition on the use in stockfarming of certain substances having a hormonal or thyrostatic action and of beta-agonists, and repealing Directives 81/602/EEC, 88/146/EEC and 88/299/EEC.

Cunningham, R., Mooney, M., Xia, X., Crooks, S., Matthews, D., O'Keefe, M., Elliot, C., 2009. Feasibility of a clinical chemical analysis approach to predict misuse of growth promoting hormones in cattle. *Anal Chem* 81, 977.

Dervilly-Pinel, G., Chereau, S., Cesbron, N., Monteau, F., Le Bizec, B., 2015a. LC-HRMS based metabolomics screening model to detect various β -agonists treatments in bovines. *Metabolomics* 11, 403-411.

Dervilly-Pinel, G., Courant, F., Chereau, S., Royer, A., Boyard-Kieken, F., Antignac, J., Le Bizec, B., 2012. Metabolomics in food analysis: application to the control of forbidden substances. *Drug Test Anal* 4, 10.

Dervilly-Pinel, G., Prévost, S., Séré, L., Le Bizec, B., 2015b. Vers des stratégies analytiques globales et non ciblées de recherche de résidus de substances interdites en élevage. *ANSES Bull Epid Santé Anim Alim* 68. 55-58.

Dervilly-Pinel, G., Rambaud, L., Sitthisack, P., Monteau, F., Hewitt, S.A., Kennedy, D.G., Le Bizec, B., 2011. 5 α -Estrane-3 β ,17 β -diol and 5 β -estrane-3 α ,17 β -diol: definitive screening biomarkers to sign nandrolone abuse in cattle? *J Steroid Biochem Mol Biol* 126, 65-71.

Directive 96/22/CE du Conseil concernant l'interdiction d'utilisation de certaines substances à effet hormonal ou thyrostatique et des substances β -agonistes dans les spéculations animales et abrogeant les directives 81/602/CEE, 88/146/CEE et 88/299/CEE.

Directive européenne N°96-23 du 29 avril 1996 relative aux mesures de contrôle à mettre en œuvre à l'égard de certaines substances et de leurs résidus dans les animaux vivants et leurs produits et abrogeant les directives 85/358/CEE et 84/469/CEE et les décisions 89/187/CEE et 91/664/CEE.

Décision 2002/657 EC du 12 août 2002 portant sur les modalités d'application de la directive 96/23/CE du conseil en ce qui concerne les performances des méthodes d'analyse et l'interprétation des résultats.

Décision 2003/181/CE du 13 mars 2003 modifiant la décision 2002/657/CE en ce qui concerne la fixation de limites de performances minimales requises (LPMR) pour certains résidus dans les aliments d'origine animale.

European Food Safety Authority (EFSA), 2014, Report for 2014 on the results from the monitoring of veteran medicinal product residues and other substances in live animals and animals products.

Gallart Ayala, H., Chéreau, S., Dervilly-Pinel, G., Le Bizec, B., 2015. Potential of mass spectrometry metabolomics for chemical food safety. *Bioanal Rev* 7, 133-146.

Jacob, C., Dervilly-Pinel, G., Biancotto, G., Monteau, F., Le Bizec, B., 2014. Global urine fingerprinting by LC-ESI(+)-HRMS for better characterization of metabolic pathway disruption upon anabolic practices in bovine. *Metabolomics*.

Janssens, G., Mangelinckx, S., Courtheyn, D., De Kimpe, N., Matthijs, B., Le Bizec, B., 2015. Simultaneous Detection of Androgen and Estrogen Abuse in Breeding Animals by Gas Chromatography-Mass Spectrometry/Combustion/Isotope Ratio Mass Spectrometry (GC-MS/C/IRMS) Evaluated against Alternative Methods. *J Agri Food Chem* 63, 7574-7581.

- Kaabia, Z., Dervilly-Pinel, G., Hanganu, F., Cesbron, N., Bichon, E., Popot, M.A., Bonnaire, Y., Le Bizec, B., 2013. Ultra high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry based identification of steroid esters in serum and plasma: an efficient strategy to detect natural steroids abuse in breeding and racing animals. *J Chromato. A* 1284, 126-140.
- Kaabia, Z., Dervilly-Pinel, G., Popot, M.A., Bailly-Chouriberry, L., Plou, P., Bonnaire, Y., Le Bizec, B., 2014. Monitoring the endogenous steroid profile disruption in urine and blood upon nandrolone administration: An efficient and innovative strategy to screen for nandrolone abuse in horses. *Drug Test Anal.* 4:376-88
- Kinkead, R.A., Elliott, C.T., Cannizzo, F.T., Biolatti, B., Mooney, M.H., 2015. Proteomic identification of plasma proteins as markers of growth promoter abuse in cattle. *Anal Bioanal Chem* 407, 4495-4507.
- Kouassi Nzoughe, J., Gallart-Ayala, H., Dervilly-Pinel, G., Biancotto, G., Le Bizec, B., 2015a. Original combination of Hydrophilic Interaction (HILIC) and Reverse Phase (RPLC) High Resolution LC-MS for characterizing lipids profile disruption in serum of anabolic implanted bovines. *Metabolomics* 11, 1884-1895.
- Kouassi Nzoughe, J.J., Dervilly-Pinel, G., Chéreau, S., Biancotto, G., Monteau, F., Elliott, C.T., Le Bizec, B., 2015b. First insights into serum metabolomics of trenbolone/estradiol implanted bovines; screening model to predict hormone-treated and control animals' status. *Metabolomics*. 11, 5, 1184–1196.
- Nebbia, C., Urbani, A., Carletti, M., Gardini, G., Balbo, A., Bertarelli, D., Girolami, F., 2011. Novel strategies for tracing the exposure of meat cattle to illegal growth-promoters. *Vet J* 189, 34-42.
- Pinel, G., Mathieu, S., Cesbron, N., Maume, D., Brabander, H.F.D., a, F.A., B, L.B., 2006. Evidence that urinary excretion of thiouracil in adult bovine submitted to a cruciferous diet can give erroneous indications of the possible illegal use of thyrostats in meat production. *Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment* 23, 974-980.
- Pinel, G., Weigel, S., Antignac, J.P., Mooney, M.H., Elliott, C., Nielen, M.W.F., Le Bizec, B., 2010. Targeted and untargeted profiling of biological fluids to screen for anabolic practices in cattle. *Trends Anal Chem* 29, 1269-1280.
- Riedmaier, I., 2015. Development of a Uniform Biomarker Signature in Calves Heart and Lung to Detect the Abuse of Different Anabolic Substances. *J Nutr Health Food Sci* 3, 01-08.
- Riedmaier, I., Becker, C., Pfaffl, M.W., Meyer, H.H., 2009a. The use of omic technologies for biomarker development to trace functions of anabolic agents *J Chromato. A* 1216, 8192-8199.
- Riedmaier, I., Benes, V., Blake, J., Bretschneider, N., Zinser, C., Becker, C., Meyer, H.H., Pfaffl, M.W., 2012. RNA-sequencing as useful screening tool in the combat against the misuse of anabolic agents. *Anal Chem* 84, 6863-6868.
- Riedmaier, I., Pfaffl, M.W., 2013. Transcriptional biomarkers--high throughput screening, quantitative verification, and bioinformatical validation methods. *Methods* 59, 3-9.

Riedmaier, I., Tichopad, A., Reiter, M., Pfaffl, M.W., Meyer, H.H., 2009b. Identification of potential gene expression biomarkers for the surveillance of anabolic agents in bovine blood cells Anal Chim Acta 638, 106-113.

Riedmaier, I., Tichopad, A., Reiter, M., Pfaffl, M.W., Meyer, H.H., 2009c. Influence of testosterone and a novel SARM on gene expression in whole blood of *Macaca fascicularis*. J Steroid Biochem Mol Biol 114, 167-173.