

# Profils suspects sous surveillance

**Bœufs dopés aux hormones, animaux ou humains nourris aux OGM... Rechercher directement dans un organisme la trace de substances jugées, à tort ou à raison, indésirables, est parfois impossible. Encore au stade de la recherche, la méthode des signatures biologiques se fonde sur l'analyse des perturbations du métabolisme.**

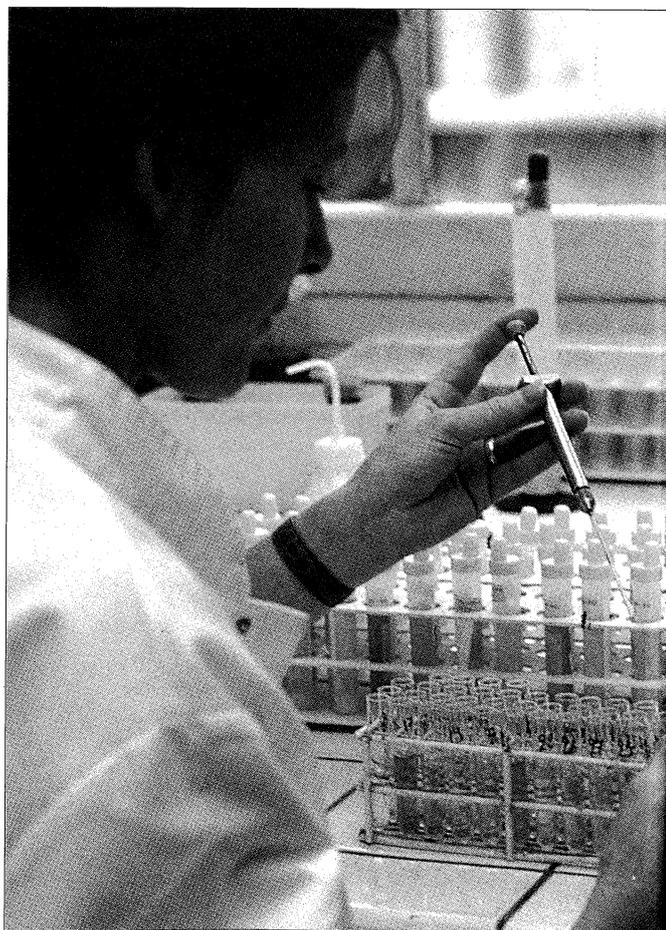
## Alain Paris

est directeur de recherche au Laboratoire des xénobiotiques de l'INRA de Toulouse (UMR 1089). [aparis@toulouse.inra.fr](mailto:aparis@toulouse.inra.fr)

Anabolisants et aliments transgéniques ont beau relever de sphères d'utilisation très différentes, il est impératif de connaître leur impact sur l'organisme qui les consomme. A l'échelle de la chaîne alimentaire, ce problème devient récurrent : comment le bœuf dopé réagit-il au produit dopant, et comment réagissons-nous à l'ingestion de bœuf dopé ? Le métabolisme d'une plante porteuse d'un gène étranger va-t-il changer au-delà de ce qu'on attendait, et cela aura-t-il des conséquences chez le consommateur de cette plante ? Les méthodes d'analyses actuelles ont pour principe la mise en évidence directe des substances dont on pense qu'elles sont toxiques pour le consommateur. Or, ces méthodes ont leurs limites. D'une part, leur efficacité se heurte au seuil de détection des tests actuellement disponibles. D'autre part, elles ne permettent de rechercher que des produits dont la nature est déjà connue. Nous développons dans notre laboratoire une méthode indirecte, qui vise à détecter la présence d'une substance anormale en considérant ses effets sur le métabolisme : c'est la méthode des signatures biologiques.

**Définition.** Qu'est-ce qu'une signature biologique ? Nous la définissons comme la mesure d'un contraste entre une situation métabolique de référence et une situation métabolique perturbée. Prenons des rats de laboratoire, des rats mâles, chez qui le rythme naturel de sécrétion de l'hormone de croissance est irrégulier, contrairement aux femelles chez qui il est soutenu. Injectons-leur un surplus de cette hormone. Ce traitement n'est pas sans effet au niveau des enzymes hépatiques impliquées dans le métabolisme des médicaments et des substances chimiques : le profil – quantité et activité – de ces enzymes chez les rats mâles ainsi traités devient très semblable à celui de rats femelles<sup>(1,2)</sup>. En l'occurrence, c'est ce déplacement qui constitue la signature biologique de l'hormone de croissance. Il reflète également la nature de la perturbation d'origine : l'activité de trois enzymes hépatiques est plus faible chez les rats traités que chez les rats témoins, alors qu'elle est plus élevée chez les rats

hypophysectomisés, c'est-à-dire complètement dépourvus d'hormone de croissance (fig. 1). Avec Marc-Emmanuel Dumas, actuellement en thèse au laboratoire, et les professeurs François André de l'Ecole nationale vétérinaire de Nantes et Joseph Vercauteren de l'université de Bordeaux, nous avons entrepris de rechercher, dans l'urine de bovins, une signature biologique trahissant l'utilisation d'un traitement anabolisant. A ce jour, la

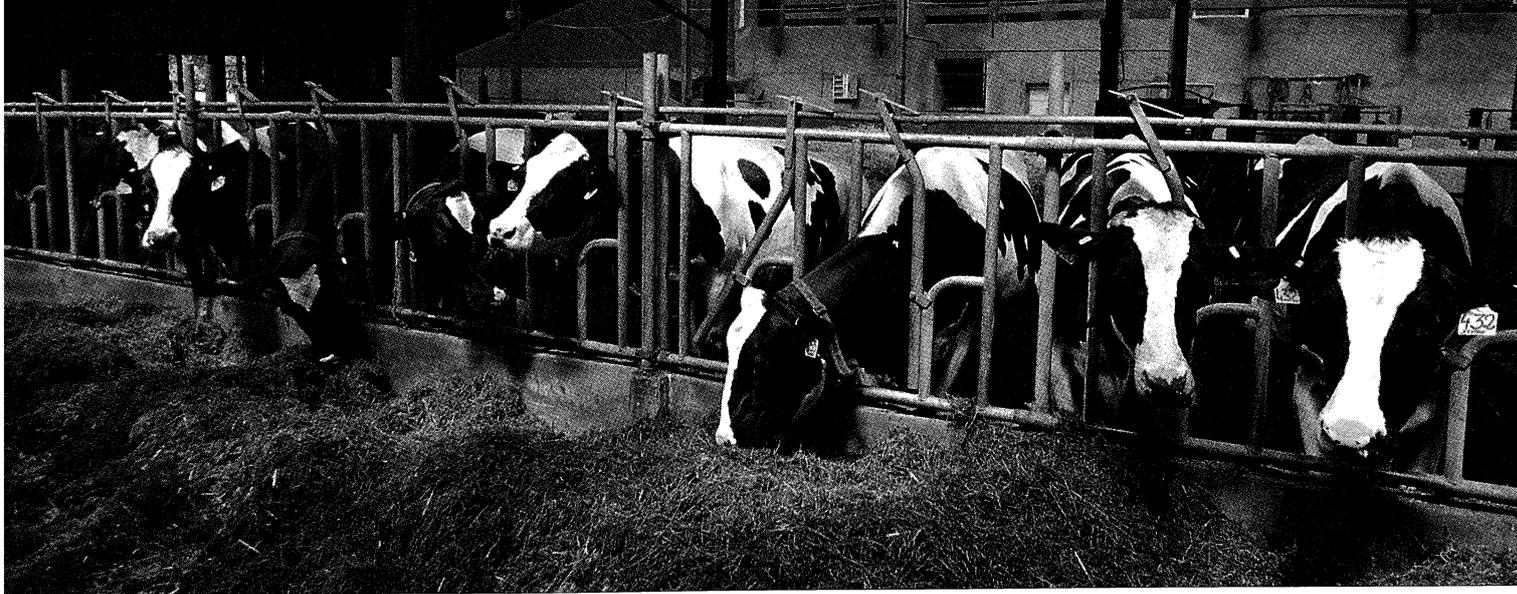


**A l'échelle du laboratoire, la méthode des signatures biologiques permet de repérer des bouillons traités avec des anabolisants, en effectuant une analyse par spectroscopie RMN sur des échantillons d'urine.** © BSIP BAJANDE

**ez la souris, l'utilisation d'hormone de croissance permet de repérer une signature biologique au niveau des enzymes du foie**

(1) F. Guéraud, thèse de doctorat de l'université Aix-Marseille III, 163 p., 1996.

(2) F. Guéraud et A. Paris, *Drug Metab. Rev.* 32 (suppl. 1), 89, 2000.



**De la mangeoire à l'estomac transitent parfois des substances pas très bien identifiées... et pas toujours directement identifiables. Comment les mettre en évidence ?**

© BIOS

**On pourrait détecter une substance illicite en repérant les modifications métaboliques qu'elle entraîne**

mise en évidence d'un tel traitement – qu'il soit à base d'hormones stéroïdiennes ou de substances  $\beta$ -adrénergiques – est directe et se fonde sur la mise en évidence du spectre de masse de la molécule suspectée, véritable empreinte chimique référencée dans des banques de données. Dans les pays où ces traitements sont illégaux (France et autres pays européens), on parvient à repérer des infractions de plus en plus anciennes, car l'amélioration constante des conditions d'analyse physico-chimique permet de détecter des quantités de plus en plus faibles de produit. C'est néanmoins une logique de course-

**L** poursuite avec les fraudeurs, puisque de nouveaux analogues des molécules interdites apparaissent régulièrement sur les marchés parallèles. Qui plus est, l'utilisation de ces substances en mélange fait que la recherche de l'une d'entre elles défie les performances analytiques actuelles. Si la procédure d'établissement de signatures biologiques était, à terme, validée en routine, elle permettrait de contourner ce problème : repérer un changement du métabolisme d'un animal testé par rapport à un animal témoin suffirait à désigner l'animal illégalement traité, quand bien même le produit dopant demeurerait inconnu.

A l'échelle du laboratoire, nous savons pour l'instant, au moyen d'une simple analyse d'urine, repérer les groupes de bouvillons traités avec des préparations anabolisantes. La méthode d'analyse consiste à quantifier par spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) les différentes substances normalement présentes dans l'urine : les groupements chimiques que portent ces molécules émettent un signal spécifique et caractéristique de chacune d'entre elles. On compare ensuite la carte analytique ainsi dressée à celle obtenue à partir d'animaux témoins. De toutes les variables étudiées, seules celles qui, après calcul statistique, permettent d'identifier une différence entre situation perturbée par l'usage d'anabolisants et situation de référence, seront considérées comme des biomarqueurs des anabolisants en question. Pour ce faire, nous utilisons actuellement une méthode de discrimination, reposant sur les statistiques multidimensionnelles, qui permet de faire ressortir les cas anormaux par comparaison avec les références.

A l'avenir, on pourrait imaginer de faire appel à un système de réseaux de neurones, gouverné par des règles d'auto-apprentissage, qui puisse rapprocher les cas anormaux mis en exergue de cas déjà répertoriés.

**Résultats préliminaires.** Dans les premiers essais que nous avons conduits sur les échantillons d'urine d'animaux élevés en environnement contrôlé, nous avons mis en évidence des signatures biologiques qui attestent d'un effet lié à la dose du produit utilisé et révèlent un état transitoire de mise en place de la perturbation, ce qui prouve le bien-fondé de la démarche entreprise. L'étape suivante est de concevoir des bases de données pouvant servir de référence pour reconnaître avec une forte probabilité un traitement interdit ou même détecter une situation physiologique atypique témoin de l'utilisation d'un nouveau cocktail anabolisant. Car il ne s'agit pas seulement de détecter une fraude : il faut aussi identifier les paramètres biochimiques et physiologiques dont la modification conduit à l'apparition de la nouvelle signature biologique. Ces dernières années, des recherches actives conduites dans le domaine de la toxicologie, notamment par l'équipe de Jeremy Nicholson (Imperial College, Londres), ont permis de mettre en place de tout nouveaux algorithmes de recherche de structures de molécules présentes dans les urines à partir des signaux détectés en RMN<sup>(3,4,5)</sup>. Cette méthode de retraitement de l'information spectroscopique devrait permettre, dans un avenir proche, de décrire plus aisément les paramètres biochimiques perturbés par tel ou tel traitement anabolisant, et ainsi de prédire la famille chimique à laquelle pourrait appartenir une nouvelle substance utilisée frauduleusement qui n'aurait, jusqu'alors, pas été répertoriée dans les bases de données.

Comment adapter cette stratégie à l'échelle d'une filière de production animale ? Au regard des instances judiciaires, seule la mise en évidence directe d'un produit dopant a valeur de preuve. La méthode des signatures biologiques pourrait être

utilisée en amont du processus de contrôle, pour mettre en évidence les cas de fraude indécélables de façon classique. Les cas ainsi repérés seraient ensuite soumis à une batterie de tests plus poussés que les tests de routine, afin de démontrer formellement la présence de tel ou tel produit. On est encore loin d'une pareille utilisation : nombreux sont les facteurs de variation qui peuvent entraîner des confusions dans la classification des nouveaux cas à analyser. Certes, il existe des outils statistiques correcteurs. Mais leur mise en application dépendra du surcoût qu'ils représenteront dans l'ensemble du dispositif.

**Application aux OGM.** La méthode des signatures biologiques pourrait également être appliquée aux produits végétaux issus de variétés transformées par génie génétique (OGM). La plupart des recherches actuellement menées dans ce domaine s'intéressent essentiellement aux possibles transferts de gènes de résistance de l'OGM vers des bactéries de la flore intestinale, ou à l'émergence de phénomènes d'allergie alimentaire. En revanche, l'éventuelle suppression ou amplification involontaire de voies métaboliques du végétal n'a, jusqu'ici, pas beaucoup attiré l'attention des toxicologues. Et pourtant... On sait que des métabolites tels que les glucosinolates des crucifères (radis, navets, choux...) ont tendance, une fois dégradés, à altérer le goût des produits. D'autres substances, par exemple l'acide phytique présent dans les céréales et la graine de soja, entravent l'assimilation du calcium, du magnésium et du fer par l'organisme. Plus

(3) J.K. Nicholson *et al.*, *Anal. Chem.* 67, 793, 1995.

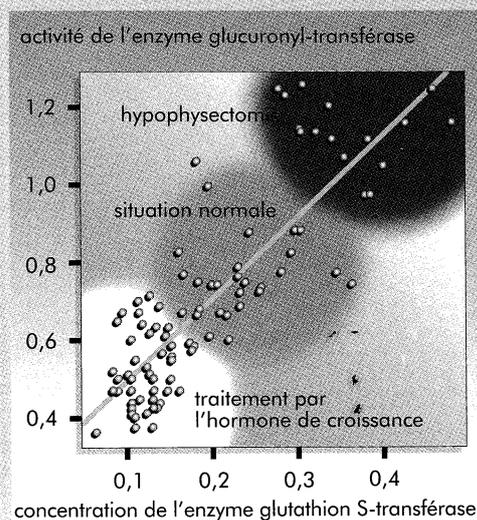
(4) J.K. Nicholson, J.C. Lindon et E. Holmes, *Xenobiotica*, 29, 1181, 1999.

(5) E. Holmes *et al.*, *Chem. Res. Toxicol.* 13, 471, 2000.

(6) W. Hashimoto *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63, 1942, 1999.

(7) H.P.J.M. Noteborn *et al.*, *Report on Food Safety Evaluation of Genetically Modified Foods*, Ministry of Economic Affairs, The Hague, 49, 1998.

## DÉPLACEMENT SIGNIFICATIF



**Figure 1.** A l'origine du concept de signature biologique : l'observation, chez la souris, que l'utilisation de l'hormone de croissance est repérable au niveau de deux enzymes du foie. La concentration de l'une et l'activité de l'autre augmentent toutes deux quand la quantité d'hormone diminue.

dangereux, les glyco-alcaloïdes (solanine, tomate) de la pomme de terre verdissante ou de la tomate ont, eux, un effet nettement toxique, se traduisant par des symptômes tels que nausées, diarrhées, fièvre, arythmie cardiaque... La teneur très réduite de ces deux composés dans les varié-

## Méthodes classiques d'analyse toxicologique

Les xénobiotiques\*, qu'il s'agisse des médicaments utilisés en santé humaine ou en santé animale, des additifs employés dans l'industrie agroalimentaire, ou des composés d'origine chimique ou microbiologique utilisés comme additifs à l'alimentation animale ou humaine, sont depuis trente ans soumis à une batterie de tests avant de recevoir leur autorisation de mise sur le marché. Tests en constante amélioration. Leur objectif : s'assurer de l'innocuité des produits en question pour le patient ou le consommateur. Ils sont effectués sur cellules ou micro-organismes en culture, sur organes isolés, et sur animaux. Le panel des tests réalisés couvre des champs très divers : analyse des paramètres sanguins (numération cellulaire, biochimie), métabolisme du produit, potentiel immuno-, neuro- et génotoxique du composé ou de ses produits de dégradation, pouvoirs tératogène\* et cancérogène, propriétés hormonales, effets sur les paramètres de développement et de croissance de l'organisme, et enfin effets sur les paramètres de reproduction des individus testés et dans certains cas de leur descendance. Les tests réalisés sur animaux de laboratoire permettent de plus d'accéder à de nombreux paramètres anatomiques après autopsie. Dans de nombreux cas, des examens histologiques complémentaires sont menés afin de préciser les cibles tissulaires et cellulaires de la substance soumise aux tests.

La grande majorité de ces tests est codifiée. Leur réalisation est le plus souvent sous-traitée auprès de laboratoires spécialisés. Un suivi draconien du déroulement de ces études toxicologiques, répondant aux exigences de l'assurance qualité en vigueur dans les laboratoires, permet de valider les résultats. Ceux-ci sont alors intégrés dans le dossier toxicologique de la molécule étudiée afin d'être soumis à une évaluation indépendante par des toxicologues appartenant aux différentes agences de réglementation (AFSSAPS en France, FDA aux Etats-Unis, MHW au Japon).

Dans le cas des aliments issus de végétaux ayant subi des modifications génétiques, l'évaluation toxicologique classique est difficilement transposable en l'état. En effet, le plus souvent, les perturbations que l'on voudrait mettre en évidence ne peuvent être expliquées par la présence d'un seul composé toxique, mais plutôt par celle de mélanges. De plus, les quantités de toxiques ingérées ne peuvent guère être augmentées qu'en accroissant la consommation de l'aliment (limité par nature), ce qui réduit d'emblée la portée des tests. L'application des critères classiques utilisés dans l'analyse du risque chimique devient inopérante : dans la majorité des cas, le résultat restera négatif. Même si la notion d'équivalents substantiels permet de comparer les aliments quant à leur composition en macroconstituants, de nouvelles approches de l'analyse de la toxicité de faibles doses de xénobiotiques co-ingérées de façon chronique restent à imaginer pour caractériser certains états subtoxicologiques.

### \*Xénobiotique

Toute substance chimique étrangère à l'organisme.

### \*Tératogène :

qui entraîne une perturbation du développement embryonnaire ou fœtal aboutissant à des malformations.

tés naturelles, résultat d'une contre-sélection constante au cours des âges, n'a entraîné que peu de risques pour le consommateur, comme les traditions culinaires peuvent en attester. Mais la situation pourrait évoluer, si les variétés créées par génie génétique se caractérisaient par des modifications profondes des voies de biosynthèse des métabolites secondaires consécutives aux processus de transfection non contrôlés de certains gènes d'intérêt.

**Projet en cours.** Les tests de toxicologie classiques *in vitro*, réalisés à partir de pommes de terre ou de tomates transgéniques, n'ont, jusqu'à présent, révélé aucune perturbation franche des teneurs en solanine ou tomatine de pommes de terre ou de tomates transgéniques<sup>(6,7)</sup>. Le problème est que la toxicité ne s'exprime pas en termes de tout ou rien : elle est le résultat d'une somme de petits effets. Une légère augmentation de la teneur des pommes de terre en solanine pourrait se révéler toxique sur le long terme chez le consommateur, bien qu'étant trop faible pour être classée à risques d'après l'analyse du végétal. Nous venons d'entreprendre, avec nos collègues généticiens et chimiométriciens de l'INRA, une étude sur les modifications de concentration en solanine dans plusieurs variétés de pomme de terre ayant subi différentes manipulations génétiques (en vue d'obtenir des plants résistant à des virus ou ayant la capacité de diminuer les teneurs des tubercules en nitrates). Tandis que nos collègues chimiométriciens travaillent au niveau du végétal lui-même, en

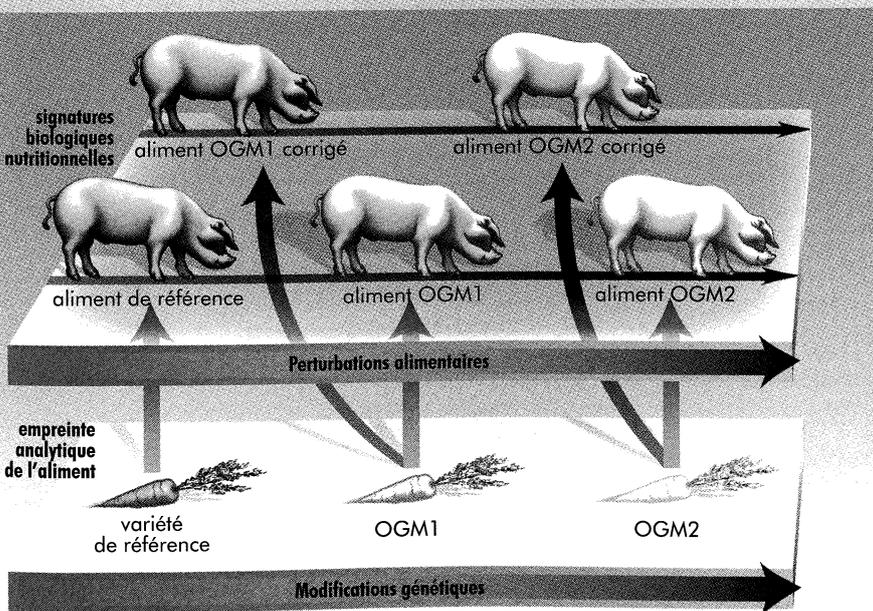
comparant l'empreinte analytique du végétal transformé à celle du végétal normal, nous nous intéressons aux signatures biologiques obtenues chez les animaux nourris d'aliments issus de ces OGM. Si notre premier objectif est de mettre en évidence la présence de solanine *via* l'enregistrement de ses effets sur le métabolisme animal, nous voulons aussi, dans un deuxième temps, établir une corrélation statistique entre une modification de l'empreinte analytique du produit végétal liée au transfert de gènes et celle du métabolisme général observée chez l'animal ayant consommé l'aliment issu de l'OGM en question (fig. 2).

Quelles sont les situations que cette approche conjointe pourrait nous permettre d'éclaircir? La plus simple est vraisemblablement celle où la composition en macroconstituants de l'aliment (amidon, lipides, protéines) est modifiée à dessein par le transfert de gènes : haute teneur en protéines pour certaines variétés de maïs transgénique, ou teneur élevée en acide oléique pour le soja. Il conviendrait de vérifier que la situation métabolique de l'animal nourri avec ces aliments, analysée grâce aux signatures biologiques, ne diffère pas de la situation métabolique de référence. Si elle devait en différer, et considérant que l'analyse des produits métaboliques urinaires peut révéler un état subtoxique, il faudrait mettre l'accent sur l'examen détaillé de l'empreinte analytique du produit alimentaire lui-même, de façon à identifier les métabolites secondaires indésirables. Par ailleurs, deux variables de nature très différente pourraient compliquer les analyses. D'une part, il faudrait pouvoir identifier les variations inhérentes au type de sol de culture utilisé ou celles découlant du climat. D'autre part, il faudrait être sûr que les observations réalisées chez l'animal sont applicables à l'homme. En raison des différences intrinsèques de métabolisme entre les différentes espèces, des états qui seraient subtoxiques chez l'homme pourraient n'être pas mis en évidence chez l'animal. Sans compter l'obstacle que constitue la différence de régime alimentaire entre l'homme et nombre d'animaux.

**Au-delà du laboratoire.** Même si un certain nombre de résultats obtenus au laboratoire sont encourageants, il faut être conscient du fait que cette démarche de quantification globale des perturbations biologiques reste, pour l'instant, spéculative. En effet, tant que les signatures biologiques n'auront pas été validées dans un certain nombre d'applications concrètes, leur emploi en routine comme outil de repérage de fraude ou critère d'évaluation toxicologique sera limité, d'autant que les méthodes analytiques mobilisées sont lourdes et coûteuses, et les traitements des données complexes. Néanmoins, cette méthode devrait, à terme, aider à mieux évaluer les premiers stades liés à la perturbation d'une situation physiologique normale, que cette perturbation soit d'origine nutritionnelle, toxicologique ou pathologique.

## Un aliment modifié certifié non toxique ne l'est peut-être pas sur le long terme : quelle signature laisse-t-il ?

### UN MODÈLE À VALIDER



**Figure 2.** Il est possible que l'ingestion d'un aliment issu d'OGM entraîne l'apparition d'une signature biologique chez l'animal. Deux hypothèses. La première est que l'on réussisse (OGM 1 corrigé) à restituer à l'animal des paramètres métaboliques normaux, en modifiant l'équilibre de sa ration alimentaire. Mais cette opération pourrait se révéler insuffisante, comme c'est le cas avec l'OGM 2. Celui-ci devra donc être considéré comme néfaste sur le plan nutritionnel.