

---

## Approches nouvelles pour la détection des résidus de promoteurs de croissance dans les produits animaux

---

M.-L. SCIPPO\*, M. CHAVEZ\*\*, V. HELBO\*, G. DEGAND\*, A. DUYCKAERTS\*, M. LION\*\*, F. RENTIER\*\*, M. MULLER\*\*, G. MAGHUIN-ROGISTER\* ET J. MARTIAL\*\*

\* Laboratoire d'analyse du département des sciences des denrées alimentaires. Université de Liège, B-43 bis Sart-Tilman, 4000 Liège.

\*\* Laboratoire de Biologie moléculaire et de Génie génétique. Université de Liège, B6 Sart-Tilman, 4000 Liège.

Le but de cette étude est de mettre au point des systèmes de détection des hormones ou résidus d'hormones stéroïdes (oestrogènes, androgènes, progestagènes, et glucocorticoïdes) ou  $\beta$ 2-adrénergiques basés sur l'utilisation des récepteurs. Deux types de systèmes sont en développement : l'un est un récepteur essai qui utilise des récepteurs recombinants produits en bactéries et repose sur une compétition pour l'occupation de sites récepteurs entre l'analyte et un ligand marqué; l'autre est un test de mise en évidence d'activités hormonales à l'aide de cellules indicatrices.

### Introduction

L'utilisation, l'innocuité et le contrôle des promoteurs de croissance en production de viande suscitent depuis plusieurs années beaucoup d'intérêt et de controverses. L'emploi à des fins d'engraissement des hormones anabolisantes et des  $\beta$ 2-agonistes est interdit dans l'Union Européenne. De même, l'utilisation de médicaments à usage vétérinaire tels que les glucocorticoïdes, est règlementée. Un marché noir des promoteurs de croissance existe non seulement en Europe, mais aussi dans des pays comme les Etats-Unis et le Canada, où l'usage de certaines substances à activité hormonale est autorisé. Dans une situation de marché noir où l'on ne connaît pas à l'avance les substances à rechercher, la stratégie du contrôle des résidus, chez les animaux et dans leurs produits, devrait être améliorée et se baser d'avantage sur des méthodes multi-analyses.

Notre étude a pour but la mise au point de systèmes de détection des hormones ou résidus d'hormones stéroïdes (oestrogènes, androgènes, progestagènes et glucocorticoïdes) ainsi que des  $\beta$ 2-agonistes, sur la base sur l'utilisation de récepteurs. Deux types de systèmes sont en développement : l'un est un récepteur essai qui utilise des récepteurs recombinants produits en bactéries et repose sur une compétition pour l'occupation de sites récepteurs entre l'analyte et un ligand marqué; l'autre est un test de mise en évidence d'activités hormonales à l'aide de cellules indicatrices.

### Matériels et méthodes

Les récepteurs aux hormones stéroïdes sont produits en bactéries sous forme de protéines fusion; seul le domaine de liaison à l'hormone, situé dans la portion C-terminale de la chaîne polypeptidique, est exprimé. Le système d'expression choisi dans *E. coli* permet d'obtenir une quantité importante de protéines recombinantes actives. Les protéines réceptrices ainsi produites sont utilisées comme réactifs dans des radio-récepteurs essais mettant en oeuvre, outre le récepteur (aux oestrogènes, androgènes, progestagènes ou glucocorticoïdes), l'hormone éventuellement présente dans l'échantillon analysé et un ligand analogue à cette hormone marqué au tritium. Après incubation, les formes libres et liées des ligands sont séparées et la mesure de la radioactivité liée au récepteur permet, en se référant à une courbe standard, de déterminer la concentration en résidus d'hormones présente dans l'échantillon.

Une système analogue est utilisé pour détecter les  $\beta$ 2-agonistes. Il a recours cette fois à une bactérie (*E. coli*) exprimant le récepteurs  $\beta$ 2-adrénergique humain dans sa membrane (Marullo et al., 1989, Helbo, 1996).

Le second système est basé sur la mesure de l'activité biologique des hormones oestrogènes, androgènes, progestagènes ou glucocorticoïdes, au moyen de cellules indicatrices. Pour cela, nous avons développé une lignée cellulaire génétiquement modifiée contenant le récepteur de l'hormone stéroïde et une séquence cible qui contrôle la transcription du gène de la

luciférase (gène « rapporteur »). L'échantillon à doser induit donc une émission de lumière en quantité proportionnelle à la concentration en stéroïdes présente dans l'échantillon.

## **Résultats et discussion**

### *Radiorécepteur essai des hormones stéroïdes*

Une étude de faisabilité a abouti à la production de deux protéines fusion fonctionnelles incluant le domaine de liaison à l'hormone stéroïde, du récepteur aux oestrogènes d'une part et du récepteur aux progestagènes d'autre part. Un radiorécepteur essai permettant la détection des oestrogènes a été mis au point. Sa spécificité (exprimée en pourcents de réaction croisée par rapport à l'oestradiol), est la suivante : éthinylœstradiol : 160 %; diéthylstilboestrol : 75 %, hexoestrol : 48 %;... La sensibilité de cette méthode (limite de détection de 0,8 ppb) permet de déterminer la concentration en oestrogènes de fractions HPLC préparées à partir d'urines collectées en vue du contrôle de l'utilisation illégale d'anabolisants (en collaboration avec C. Arts, TNO, Pays-Bas).

### *Radiorécepteur essai des hormones $\beta_2$ adrénergiques*

Un radiorécepteur essai pour la détection des  $\beta_2$ -agonistes basé sur l'utilisation d'*E. coli* exprimant le récepteur humain  $\beta_2$ -adrénergique (don de D. Strosberg, Hôpital Cochin, Paris) a été mis au point (Helbo, 1996). Sa sensibilité est suffisante pour détecter des résidus de clenbutérol dans l'urine à la concentration de 2 ppb.

### *Test d'activité biologique sur cellules*

Des expériences préliminaires, impliquant la transfection transitoire de cellules ont été réalisées avec des substances standards, pour les hormones glucocorticoïdes, oestrogènes et progestagènes. La sensibilité des tests semble suffisante pour réaliser des dosages d'hormones dans les échantillons biologiques provenant d'animaux traités par des substances interdites.

## **Conclusions et perspectives / Implications pratiques**

L'étude de faisabilité a fourni des résultats tels qu'il est permis d'envisager le développement de ces méthodes nouvelles de détection des résidus des promoteurs de croissance interdits, et ce en vue de produire des trousse de dosage. Ces systèmes multi-analytes pourraient être utilisés comme méthode de dépistage lors des contrôles. Les échantillons positifs seraient ensuite confirmés par analyses physicochimiques (chromatographie/spectrométrie de masse) qualitatives et si nécessaire quantitatives permettant ainsi l'identification et éventuellement la détermination de la concentration des résidus dans les produits animaux.

Une approche similaire pour la détermination des résidus d'antibiotiques (en collaboration avec le Laboratoire d'hormonologie, CER, Marloie) fait actuellement l'objet d'une recherche financée par le Ministère des Classes Moyennes et de l'Agriculture.

### **Références bibliographiques**

Helbo V., Vandenbroeck M. and Maghuin-Rogister G. *Archiv für Lebensmittelhygiene* 45 (1994) 57-61.

Helbo V. Mémoire de licence en hygiène et technologie des denrées alimentaires d'origine animale, 1996.

Muller M. and Renkawitz R. *Biochim. Biophys. Acta* (1990) 1088, 171-160.

Marullo, S., Delavier, C., Emorine, L., Strosberg, D., 1989, Brevet européen n° EP 0 344 024 A1.

Cette étude a été financée par la Direction Générale des Technologies, de la Recherche et de l'Énergie du Ministère de la Région wallonne (contrat n°2415).