



HAL
open science

Intérêt thérapeutique de la radio-sensibilisation dans le traitement des carcinomes épidermoïdes buccaux chez le chien et le chat

Elena Vukovic

► **To cite this version:**

Elena Vukovic. Intérêt thérapeutique de la radio-sensibilisation dans le traitement des carcinomes épidermoïdes buccaux chez le chien et le chat. Sciences du Vivant [q-bio]. 2024. dumas-04781444v1

HAL Id: dumas-04781444

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04781444v1>

Submitted on 13 Nov 2024 (v1), last revised 27 Nov 2024 (v2)

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ANNEE 2024 - Thèse n° 64

IDENTIFICATION CHEZ LES OVINS D'UN MARQUEUR D'EXPOSITION INTERNE SIGNANT L'ORIGINE ILLEGALE DU THIOURACILE.

THÈSE

pour l'obtention du diplôme d'État de

DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

présentée et soutenue publiquement devant

l'UFR de Médecine de l'Université de

Nantes le 30 septembre 2024

par

Nathan Nicolas DOZIAS

Sous la direction de

Monsieur Bruno Le Bizec

Président du jury : **Monsieur Raphaël GUATTEO**, Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire Agroalimentaire et de l'Alimentation (VetAgroBio Nantes)

Rapporteur : **Monsieur Bruno LE BIZEC**, Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire Agroalimentaire et de l'alimentation (VetAgroBio Nantes)

Assesseur : **Madame Meg-Anne MORICEAU**, Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire Agroalimentaire et de l'Alimentation (VetAgroBio Nantes)

Membres invités : **Madame Gaud DERVILLY-PINEL**, Ingénieur de recherche HDR à l'Ecole Nationale Vétérinaire Agroalimentaire et de l'Alimentation (VetAgroBio Nantes)

Madame Audrey POIRIER, Ingénieur d'étude à l'Ecole Nationale Vétérinaire Agroalimentaire et de l'Alimentation (VetAgroBio Nantes)

Département BPSA Biologie, Pathologie et Sciences de l'Aliment		
Responsable : Emmanuel JAFFRES – Adjointe : Frédérique NGUYEN		
Pharmacologie et Toxicologie	Jean-Claude DESFONTIS (Pr) Yassine MALLEM (Pr) Hervé POULIQUEN (Pr)	Antoine ROSTANG (MC) Meg-Anne MORICEAU (CERC) Martine KAMMERER (Pr émérite) Marc GOGNY (Pr émérite)
Physiologie fonctionnelle, cellulaire et moléculaire	Jean-Marie BACH (Pr) Lionel MARTIGNAT (Pr) Julie HERVE (MC HDR) Grégoire MIGNOT (MC)	Solenn GAVAUD (CERC)
Histologie et anatomie pathologique	Marie-Anne COLLE (Pr) Jérôme ABADIE (MC)	Laetitia JAILLARDON (MC) Frédérique NGUYEN (MC)
Biochimie alimentaire industrielle	Carole PROST (Pr) Joëlle GRUA (MC)	Clément CATANEO (MC) Alix KHALIL (MC) Laurent LE THUAUT (MC)
Microbiotech	Hervé PREVOST (Pr) Géraldine BOUE (MC) Nabila HADDAD (MC) Emmanuel JAFFRES (MC)	Mathilde MOSSER (MC) Boris MISERY (MC) Raouf TAREB (MC) Quentin PRUVOST (CEC)
PACENV = VET1	Eléonore BOUGUYON (PRAG) Nicolas BROSSAUD (PRAG)	Charlotte MOCQUARD (PRAG) Aurore CALVEL (PRAG)
Département SAESP Santé des Animaux d'Élevage et Santé Publique		
Responsable : Raphaël GUATTEO – Adjoint : Jean-Michel CAPPELIER		
Élevage, nutrition et santé des animaux domestiques	Nathalie BAREILLE (Pr) François BEAUDEAU (Pr) Christine FOURICHON (Pr)	Juan Manuel ARIZA CHACON (MC) Ségolène CALVEZ S(Pr) Aurélien MADOUASSE (MC) Nora NAVARRO-GONZALES (MC)
Infectiologie	Alain CHAUVIN (Pr) Emmanuelle MOREAU (Pr) Nathalie RUVOEN-CLOUET (Pr) Pauline MAISONNASSE (CERC)	Albert AGOULON (MC) Suzanne BASTIAN (MC) Léa LOISEL (AERC) Kenny OBERLE (MC) Nadine RAVINET (MC)
Médecine des animaux d'élevage	Catherine BELLOC (Pr) Christophe CHARTIER (Pr émérite) Raphaël GUATTEO (Pr) Anne RELUN (MC)	Sébastien ASSIE (MC) Isabelle BREYTON (MC) Mily LEBLANC MARIDOR (MC) Maud ROUAULT (AERC)
Hygiène et qualité des aliments	Jean-Michel CAPPELIER (Pr) Louis DELAUNAY (CERC) Bruno LE BIZEC (Pr) Marie-France PILET (Pr)	Sofia STRUBBIA (MC)

Département DSC Sciences cliniques		
Responsable : Catherine IBISCH – Adjoint : Marion FUSELLIER		
Anatomie comparée	Eric BETTI (MC) Claude GUINTARD (MC) Margarida RIBEIRO DA SILVA NEUNLIST (MC Stagiaire)	
Pathologie chirurgicale et anesthésiologie	Eric AGUADO (Pr) Olivier GAUTHIER (Pr) Eric GOYENVALLE (MC HDR)	Pierre MAITRE (MC) Caroline TESSIER (MC) Gwénola TOUZOT-JOURDE (MC) Claire DEFOURMSTRAUX (MC)
Dermatologie, parasitologie des carnivores et des équidés, mycologie	Jacques GUILLOT (Pr) Emmanuel BENSIGNOR (Pr Ass)	Sabrina VIEU (AERC) Maria Dolores SANCHEZ (AERC)
Médecine interne, imagerie médicale et législation professionnelle vétérinaire	Anne COUROUCE (Pr) Jack-Yves DESCHAMPS (Pr) Françoise ROUX (Pr) Juan HERNANDEZ-RODRIGUEZ (Pr Ass) Nora BOUHSINA (MC)	Nicolas CHOUIN (MC) Amandine DRUT (MC) Marion FUSELLIER-TESSON (Pr) Catherine IBISCH (MC) Aurélia LEROUX (MC) Odile SENECAT (MC)
Biotechnologies et pathologie de la reproduction	Jean-François BRUYAS (Pr) François FIENI (Pr)	Djemil BENCHARIF (Pr) Lamia BRIAND (Pr)
Département GPA Génie des procédés alimentaires		
Responsable : Sébastien CURET-PLOQUIN – Adjointe : Vanessa JURY		
Lionel BOILLEREAUX (Pr) Sébastien CURET-PLOQUIN (Pr) Marie DE LAMBALLERIE (Pr) Francine FAYOLLE (Pr) Michel HAVET (Pr)	Alain LEBAIL (Pr) Olivier ROUAUD (Pr) Kévin CROUVISIER-URION (MC) Vanessa JURY (Pr) Emilie KORBEL (MC)	Jean-Yves MONTEAU (MC HDR) Eve-Anne NORWOOD (MC) Raphaël PORYLES (MC) Laurence POTTIER (MC) Cyril TOUBLANC (MC)
PAC-ING	Cyril Gaillard (PCEA)	
Département MSC Management, statistiques et communication		
Responsable : Samira ROUSSELIERE – Adjointe : Véronique CARIOU		
Mathématiques, statistiques, informatique	El Mostafa QANNARI (Pr émérite) Chantal THORIN (Pr Ag) Evelyne VIGNEAU (Pr) Jean-Michel GALHARRET (MC stagiaire)	Véronique CARIOU (Pr) Benjamin MAHIEU (MC) Michel SEMENOU (MC)
Economie, gestion, législation	Jean-Marc FERRANDI (Pr) Pascal BARILLOT (MC) Ibrahima BARRY (MC) Florence BEAUGRAND (MC)	Sibylle DUCHAINE (MC) Sonia MAHJOUB (MC) Samira ROUSSELIERE (MC) Christophe PAPINEAU (Ens. Cont.)
Langues et communication	Marc BRIDOU (PLPA) David GUYLER (Ens. Cont.) Nathalie GOODENOUGH (PCEA) Patricia JOSSE (Ens. Cont.)	Shaun MEEHAN (Ens. Cont.) Linda MORRIS (PCEA) Ian NICHOLSON (ENS. Cont.)

Pr Ag : Professeur Agrégé, Pr : Professeur, MC : Maître de Conférence, MCC : MC contractuel,
PLPA : Professeur Lycée Professionnel Agricole, PCEA : Professeur Certifié Enseignement Agricole,
HDR : Habilité à Diriger des Recherches, CERC : Chargé d'Enseignement et de Recherche Contractuel, Ens.
Cont. : Enseignant Contractuel

Remerciements

A Monsieur Bruno LE BIZEC

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire Agroalimentaire et de l'Alimentation (Vetagrobio Nantes). Pour avoir accepté de suivre et d'encadrer cette thèse. Pour votre disponibilité et la transmission de votre intérêt pour la recherche. Sincères remerciements.

A Monsieur Raphaël GUATTEO

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire Agroalimentaire et de l'Alimentation (Vetagrobio Nantes). Pour avoir accepté d'évaluer ce travail et d'avoir contribué à ma formation vétérinaire. Sincères remerciements.

A Madame Meg-Anne MORICEAU

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire Agroalimentaire et de l'Alimentation (Vetagrobio Nantes).

Pour avoir accepté d'évaluer ce travail. Sincères remerciements.

A Madame Audrey POIRIER

Ingénieur d'étude à l'Ecole Nationale Vétérinaire Agroalimentaire et de l'Alimentation (Vetagrobio Nantes).

Pour son soutien technique et scientifique à la réalisation de ce travail. Pour m'avoir fait découvrir le milieu de la recherche et pour tout ce que m'a apporté cette thèse. Qu'elle reçoive ici l'expression de ma profonde gratitude.

A Madame Gaud DERVILLY-PINEL

Ingénieur de recherche HDR à l'Ecole Nationale Vétérinaire Agroalimentaire et de l'Alimentation (Vetagrobio Nantes).

Pour m'avoir permis de réaliser cette thèse au sein du LABERCA et de l'aide dans la réalisation de cette thèse. Qu'elle trouve ici l'expression de mes remerciements les plus sincères.

A l'ensemble de l'équipe du Laboratoire d'Etude des Résidus et Contaminants dans les Aliments.

Pour votre soutien et votre aide dans la réalisation de ce travail. Sincères remerciements.

Tables des matières

Tables des matières

Tables des matières	6
Liste des annexes.....	10
Liste des figures	10
Liste des tableaux	11
Liste des abréviations	12
Introduction générale.....	13
Partie 1: Les antithyroïdiens : présentation, usage en tant que promoteurs de croissance et stratégies de contrôle au sein de l'Union Européenne	
1. Présentation des thyrostatiques.....	15
1.1 Définition	15
1.2 Pharmacocinétique.....	17
1.3 Hormones thyroïdiennes et mécanisme d'action des antithyroïdiens	22
1.3.1 Physiologie de la thyroïde.....	22
1.3.2 Effet physiologique des hormones thyroïdiennes sur l'organisme.....	24
1.3.3 Mécanismes de l'effet antithyroïdien des ATS.....	24
1.4 Utilisations thérapeutiques des antithyroïdiens	25
1.4.1 Médecine humaine.....	25
1.4.2 Médecine animale	25
1.5 Utilisations en tant que promoteurs de croissance.....	25
1.6 Effets des thyrostatiques sur la productivité des principales espèces de production.....	26
1.6.1 L'effet « anabolisant » des thyrostatiques	26
1.6.2 Effet chez les autres espèces de production	27
1.6.3 Effet chez l'ovine	28
1.7. Impact pour le consommateur	28
1.7.1 Risque lié à l'utilisation des antithyroïdiens en élevage	28
1.7.2 Impact sur la carcasse et la qualité de la viande	29
2. Réglementation des substances antithyroïdiennes.....	29
2.1. Historique et acteurs de la réglementation.....	29
2.2 La réglementation en France	31
2.3 Les plans actuels de surveillance et de contrôle	32
3. Avancée des recherches scientifiques	33
3.1 Observation et compréhension de la présence de 2-thiouracile chez des animaux non traités	33
3.2 Les brassicacées, compréhension dans la présence endogène de 2-thiouracile	35

3.3 Différencier le statut endogène / exogène du 2-thiouracile à l'aide de biomarqueurs spécifiques	36
3.4 Les stratégies décisionnelles	38
4. L'analyse des thyrostatiques par LC-MS/MS.....	40
4.1. Historique des méthodes d'analyse des thyrostatiques.....	40
4.2. LC-MS/MS technique privilégiée pour l'analyse des thyrostatiques	41
5. Objectif de la thèse.....	42
Partie 2: Partie expérimentale	
1. Présentation et objectif de l'expérience.....	43
2. Matériels et méthodes	43
2.1 Expérimentation animale	43
2.1.1 Présentation des animaux d'expérience.....	43
2.1.2 Gestion technique des animaux	44
2.1.3 Les différentes matrices étudiées et les méthodes de prélèvement	45
2.1.4 Préparation du 2-thiouracile à administrer	46
2.1.5 Protocole d'administration et de collecte des échantillons.....	46
2.2 Matériel et réactif.....	47
2.2.1 Substance de référence, produits chimiques et réactifs	47
2.2.2 Equipement	48
2.3 Technique analytique et appareils de mesure.....	48
2.3.1 Préparation de l'échantillon	48
2.3.2 Extraction liquide / liquide	49
2.3.3 Séparation chromatographique.....	49
2.4 Performances et critères de qualité de la méthode d'analyse	51
3. Résultats	52
3.1 Présentation de chromatogrammes.....	52
3.2 Vérification des résultats	54
3.3 Cinétique d'élimination urinaire du 2-thiouracile et de ses métabolites	56
3.3.1 Comparaison des excrétions du 2-thiouracile et de ces métabolites.....	56
3.3.2 Cinétique d'élimination urinaire du 2-thiouracile et de ses métabolites	57
3.4 Cinétique d'élimination urinaire du 2-thiouracile et de ses analogues chez la brebis avec une ration enrichie en brassicacées	59
4. Discussion	60
4.1 Bilan des résultats	60
4.2 Validité des résultats	60

4.3 Impact de l'administration de 2-thiouracile sur l'excrétion urinaire de 2-thiouracile et de ses métabolites.....	61
4.4 Usage du 6-méthylthiouracile comme biomarqueur discriminant de l'usage illégal du 2-thiouracile chez les ovins.....	63
4.5. Discussion de l'effet d'une ration enrichie en brassicacée sur l'excrétion urinaire de 2-thiouracile et apparenté.....	69
4.6 Perspectives.....	70
Conclusion générale	71
BIBLIOGRAPHIE.....	8173
Annexe :	7381

Liste des annexes

Annexe 1 : Représentation de l'hydrolyse des glucosinolates due à une enzyme, la myrosinase

Annexe 2 : Feuille de critères d'identification (2002/657/CE) pour les analyses de confirmation par chromatographie couplée à la spectrométrie de masse

Annexe 3 : Feuille de quantification pour les analyses de confirmation par chromatographie couplée à la spectrométrie de masse

Annexe 4 : courbe d'élimination urinaire du 2-TU, 4-TU, 5-MTU et 6-MTU chez une brebis traitée

Liste des figures

Figure 1: structure chimique du thiouracile (2-TU ou TU), 4-thiouracile (4TU), 5-méthylthiouracile (5-MTU), 6-méthylthiouracile (6-MTU), éthyl-thiouracile (ETU), dimethyl-thiouracile (DMTU), propyl-thiouracile (PTU), phenyl-thiouracile (PhTU), benzyl-thiouracile (BTU), mercaptobenzimidazole (MBI), benzylpropylthiouracile (BPTU) et TU dérivé avec le 3-iodobenzylbromide.....	16
Figure 2: structure chimique commune aux ATS et exemple de la structure des glucosinolates	16
Figure 3 : les six formes tautomériques principales du 2-thiouracile (G. Pinel et al. 2006).....	17
Figure 4 : structure chimique et possible lien métabolique avec le thiouracil administré.	19
Figure 5 : courbe d'excrétion du 2-thiouracile (RIKILT Wageningen 2014).....	20
Figure 6 : boxplots des concentrations urinaires en TU post traitement. Ligne rouge : dernier résultat encore significativement différent de celui des contrôles.	21
Figure 7 : synthèse des hormones thyroïdiennes (Boron, Boulpaep 2012; Herve Julie 2024).....	23
Figure 8 : chronologie de la réglementation européenne des ATS	31
Figure 9 : fréquence de distribution du thiouracil dans des échantillons d'urine de veau	34
Figure 10 : élimination urinaire de 2-thiouracile, Pinel et al. (2006).....	35
Figure 11: stratégies de décision pour le porc et le bovin (d'après Blokland et al. 2022).....	39
Figure 12: thyroïde de bovin physiologique (17g), thyroïde sous influence de MTU (196g), goitre important (633g).	40
Figure 13 : dérivation du 2-thiouracile avec le 3-IBBr	41
Figure 14 : box paillé des brebis	44
Figure 15 : couloir individuel de collecte.....	45
Figure 16 : diagramme illustrant les étapes de l'extraction liquide/liquide	49
Figure 17 : chromatogrammes d'ion d'un échantillon d'urine témoin et d'un échantillon d'une brebis traitée au 2-thiouracile.....	53
Figure 18 : courbe d'élimination urinaire du 2-TU chez une brebis traitée.....	58
Figure 19 : courbe d'élimination urinaire du 4-TU, 5-MTU et 6-MTU chez une brebis traitée	58
Figure 20 : excrétion urinaire de 2-thiouracile et ses métabolites chez la brebis avec une ration enrichie en brassicacées.....	59
Figure 21 : diagrammes de la concentration logarithmique ($\mu\text{g/L}$) de 2-thiouracile dans les échantillons d'urine.....	62
Figure 22 : formation de 5-MTU et 6-MTU à partir de glucosinolates	65
Figure 23 : méthylation du 2-TU en 6-MTU.....	66
Figure 24 : réaction de méthylation de l'uracile catalysée par une enzyme	67

Liste des tableaux

Tableau I: résultats des plans de contrôle chez les bovins et ovins ; données recueillies des rapports de l'EFSA de 2007 à 2022 (Pour 2022 : (European Food Safety Authority, Salvatore, Ferrer 2024))	32
Tableau II : concentrations urinaires de 2-thiouracile d'animaux de production (d'après Le Bizec et al. 2011; Wauters et al. 2015)	33
Tableau III : concentration moyenne ($\mu\text{g/L}$) et intervalle de confiance à 95% des concentrations de 2-thiouracile et de ses métabolites des bovins de l'expérience et des contrôles nationaux (Blokland et al. 2021).....	38
Tableau IV : présentation des MMPR pour les ATS (EURL MMPR guidance paper 2020)	38
Tableau V : étude de détection du 2-thiouracile sur différentes matrices par chromatographie et spectrométrie de masse	41
Tableau VI: protocole de l'expérimentation	47
Tableau VII : gradient d'éluion.....	49
Tableau VIII : temps de rétention indicatif des analytes	50
Tableau IX : paramètre associé du spectromètre de masse	50
Tableau X : transitions diagnostiques suivies pour chaque analyte	51
Tableau XI : concentrations du 2-TU et de ses métabolites dans 179 échantillons d'urine d'ovins	55
Tableau XII : concentrations urinaires maximales du 2-thiouracile et de ses métabolites observés pendant l'expérience (en $\mu\text{g/L}$) * donnée du témoin en enlevant un point aberrant.	56
Tableau XIII : concentrations urinaires moyennes du 2-thiouracile et de ses métabolites observés pendant les 3 jours d'administration et les 3 jours avant (en $\mu\text{g/L}$).	56

Liste des abréviations

2-TU : 2-ThioUracile = Thiouracile

3-IBBr : 3-IodoBenzylBromide

4-TU : 4-ThioUracile

5-MTU : 5-MéthylThioUracile

6-MTU : 6-MéthylThioUracile

ATS : AntiThyroïdiens de Synthèse

CAPAE : Centre Anti-Poison Animal et Environnemental

CC α : Limite de décision au risque α

CC β : Limite de détection au risque β

DDETSPP : Direction Départementale de l'Emploi, du Travail, des Solidarités et de la Protection des Populations

DDPP : Direction Départementale de la Protection des Populations

DGAL : Direction Générale de l'Alimentation

GC : Chromatographie en phase Gazeuse

INRAE : Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'alimentation et l'Environnement

LABERCA : LABORatoire d'Étude des Résidus et Contaminants dans les Aliments

LC : Chromatographie en phase Liquide

LC-MS : Chromatographie en phase Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse

LC-MS/MS : Chromatographie en phase Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse en tandem

LNR : Laboratoire National de Recherche

MMPR : Minimum Method Performance Requirements

MTU : Méthylthiouracile

PSPC : Plan de Surveillance et de Contrôle

PTU : Propyl-ThioUracil

PV : Poids vif

TR : Temps de Rétention

TRH : Thyreotropin Releasing Hormone

TSH : ThyreoStimuline Hormone

TU : ThioUracile

UCO : Unité COntaminants

UE : Union Européenne

UMR : Unité Mixte de Recherche

UPC : Unité Promoteur de Croissance

Introduction générale

L'Union Européenne remplit de vastes missions dans de multiples domaines, de l'économie au social jusqu'à l'environnement. Une des plus importantes de ces missions est d'assurer la sécurité des aliments et l'innocuité des produits consommés par ses citoyens. Avec l'une des réglementations les plus strictes au monde, l'UE assure un contrôle de la qualité et de la traçabilité de ses produits, malgré des marchés économiques toujours plus complexes avec une multitude d'acteurs et ouverts à l'international. De nombreux scandales et débats sur l'alimentation rendent les organismes de l'UE soucieux de cette thématique. Dans les années 1990, des crises comme celle dite de la « vache folle » ou celle des « bœufs aux hormones » font comprendre l'importance d'une réglementation et d'un contrôle efficace des procédés d'élevage. Mais aussi l'importance d'une évaluation du risque séparée de la gestion du risque et la disponibilité de méthodes analytiques permettant d'anticiper de nouvelles stratégies de fraude. Entre les années 1960 et 1980, l'utilisation des antithyroïdiens comme promoteurs de croissance à des fins d'engraissement a suscité de vives réactions de la part de la presse et soulevé des interrogations concernant l'innocuité de ce type de substances. C'est pourquoi, en 1981, l'UE interdit son utilisation pour les animaux d'élevages.

Le LABERCA, LABoratoire d'Etude des Résidus et Contaminants dans les Aliments, unité de recherche d'Oniris Vetagrobio Nantes et laboratoire français de référence (LNR) pour les promoteurs de croissance rentre parfaitement dans ce rôle de contrôle et de recherche. Le LNR est composé de l'unité promoteurs de croissance (UPC) et de l'unité contaminant (UCO). L'UPC se charge du contrôle de l'utilisation de promoteurs de croissance chez les animaux d'élevages. En plus des ATS, l'UPC recherche les résidus de stéroïdes, de β -agonistes et de corticostéroïdes. Le laboratoire se concentre sur la mesure des contaminants et résidus pouvant être présents dans les matrices biologiques et alimentaires et contribue à la gestion du risque associé. Pour cela, la spectrométrie de masse va être d'une utilité pour déterminer de manière qualitative et quantitative les éléments à détecter. Des plans de surveillance et de contrôle sont réalisés annuellement dans les états membres de l'Union Européenne pour s'assurer que les ATS ne soient pas utilisés en élevage.

Le Laberca a démontré que la présence de thiouracile pouvait être, non seulement liée à une administration frauduleuse, mais aussi liée à d'autres facteurs tels que l'alimentation. En effet, les plantes de la famille des brassicacées possèdent des précurseurs du thiouracile et leur ingestion par les animaux d'élevages peut amener à une excrétion de thiouracile dans l'urine (G. Pinel et al. 2006). Les seuils mis en place de 10 $\mu\text{g/L}$ d'urine pour les bovins et 30 $\mu\text{g/L}$ pour les porcs sont parfois dépassés par des individus qui n'ont pourtant pas reçu d'administration illégale d'ATS. Ces cas de faux positifs remettent en cause le processus de décision et l'utilisation de seuils actuels dans le cadre du contrôle de l'usage du thiouracile. La présence de thiouracile due à des facteurs autres que son administration illégale est une problématique pour les organismes de contrôle. C'est pourquoi l'enjeu de comprendre cette présence naturelle de thiouracile et de trouver une solution pour détecter efficacement les animaux traités est crucial. Les autres ATS ayant été utilisés à des fins anabolisantes comme le 6-

méthylthiouracile ou le propylthiouracile ne posent pas la même problématique car ils ne sont pas retrouvés naturellement chez les animaux de production.

Des études ont récemment permis de faire des avancées dans la recherche de critères spécifiques à l'usage du thiouracile. La détection de certains métabolites du thiouracile a permis de trouver des critères plus spécifiques pour discriminer les situations de fraudes d'une présence naturelle de 2-TU dans l'urine ou d'autres matrices animales. Ces études ont montré que pour le bovin et le porc, le 6-MTU est un bon candidat pour faire cette discrimination (Van Meulebroek et al. 2018a; Blokland et al. 2021).

Cependant, peu d'études ont été conduites sur les ovins et l'état actuel des connaissances pour l'espèce ovine est bien inférieur à celui que l'on peut trouver chez les bovins. Il n'existe pas à l'heure actuelle de biomarqueurs spécifiques à ces situations de fraude pour les ovins. Le but de ce travail est d'évaluer si la présence de 6-MTU peut être spécifique de l'administration de thiouracile comme il l'a été démontré pour l'espèce bovine et porcine.

L'expérience montée dans ce travail vise à comparer l'élimination urinaire de thiouracile et de ses métabolites entre une brebis témoin et deux brebis ayant reçu une administration à hauteur de 2 g/ 100kg de PV et 0,2g/100kg de PV de thiouracile (2-TU) pendant trois jours.

Afin de comprendre au mieux l'état des connaissances actuelles sur la présence de thiouracile chez les ovins et les méthodes de contrôle au sein de l'Union Européenne, une étude bibliographique fera l'objet de la première partie de cette thèse. Après avoir abordé les matériels et méthodes utilisés, les résultats seront discutés avant une mise en perspective de nos observations dans le contrôle officiel.

Partie I Les antithyroïdiens : présentation, usage en tant que promoteurs de croissance et stratégies de contrôle au sein de l'Union Européenne

1. Présentation des thyrostatiques

1.1 Définition

Les ATS ou thyrostatiques, en inhibant la production des hormones thyroïdiennes, provoquent une perturbation des différents métabolismes se trouvant sous la dépendance directe de ces hormones. Certains effets secondaires ont été attribués à l'usage des ATS et on a pu constater une dérive de leur utilisation primaire. Ainsi, l'augmentation de poids générée par les ATS a été utilisée dans la perspective d'optimiser l'engraissement des animaux de production (Vanden Bussche et al. 2009; Site du Collège National de Pharmacologie Médicale). L'expression « anti-hormone » qualifiait autrefois les thyrostatiques. Cette dénomination est désuète car les antithyroïdiens ne viennent pas contrer l'action des hormones thyroïdiennes mais inhiber leur synthèse. (de Brabander, Verbeke 1984)

Plusieurs familles de molécules antithyroïdiennes existent. Nous pouvons regrouper ensemble les thyrostatiques artificiels, synthétisés par l'homme, mis au point pour lutter contre des maladies hyperthyroïdiennes. Des molécules dites inorganiques telles que des ions possèdent une activité antithyroïdienne, c'est le cas du lithium (Li), de l'ion perchlorate (ClO_4^-) et du thiocyanate (SCN^-) (Vanden Bussche et al. 2009). Il existe aussi des molécules provenant du monde végétal qui possèdent une activité thyrostatique naturelle. Les brassicacées sont connues pour avoir une telle activité antithyroïdienne due à la présence naturelle de glucosinolates. (Vanden Bussche et al. 2009)

Les antithyroïdiens de synthèse d'intérêt sont majoritairement dérivés de la thiourée, composé organosulfuré de formule $\text{SC}(\text{NH}_2)_2$. Il s'agit de thioamides dont le thioacétamide est l'un des composés des plus courants. Ces molécules sont le plus souvent polaires, amphotères et de faible poids moléculaire (Vanden Bussche et al. 2009). Deux familles de molécules peuvent être citées : la famille des imidazolés (carbimazole, méthimazole) et la famille des thiouraciles (propylthiouracile, benzylthiouracile, méthylthiouracile...). (Site du Collège National de Pharmacologie Médicale; Paris et al. 2006). Les structures chimiques des principaux ATS d'intérêt sont illustrées dans la figure 1 ci-dessous.

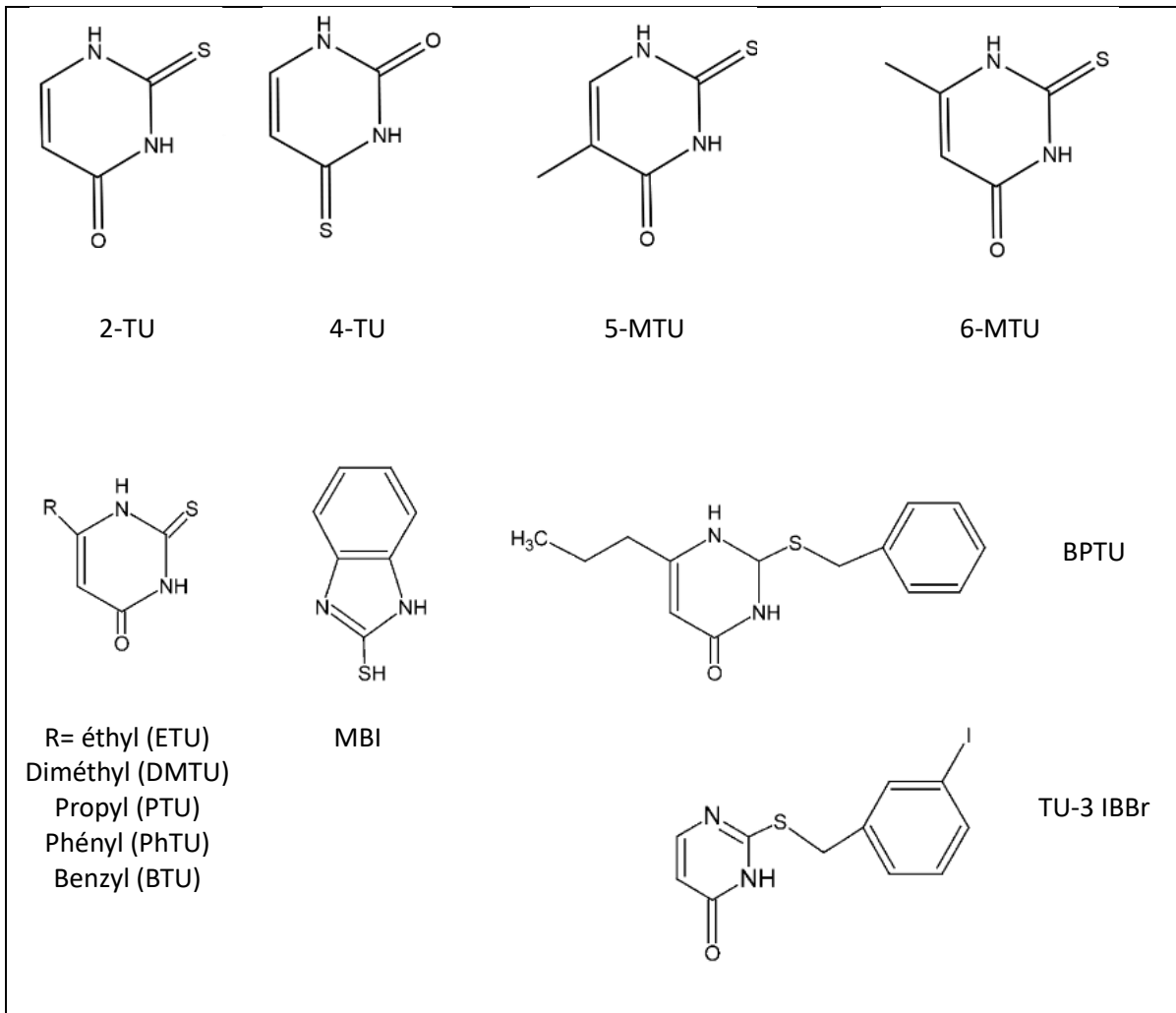


Figure 1: structure chimique du thiouracile (2-TU ou TU), 4-thiouracile (4TU), 5-méthylthiouracile (5-MTU), 6-méthylthiouracile (6-MTU), éthyl-thiouracile (ETU), diméthylthiouracile (DMTU), propyl-thiouracile (PTU), phényl-thiouracile (PhTU), benzyl-thiouracile (BTU), mercaptobenzimidazole (MBI), benzylpropylthiouracile (BPTU) et TU dérivé avec le 3-iodobenzylbromide. (Pinel et al. 2005; Blokland et al. 2021)

On peut y observer la présence commune du groupe isothiocyanate définie par la séquence R-N=C=S (Figure 2). C'est cette séquence d'azote, de soufre et de carbone qui est sûrement responsable de l'inhibition de la synthèse des hormones thyroïdiennes, même si le mécanisme exact de l'inhibition n'est pas parfaitement connu aujourd'hui (Vanden Bussche et al. 2009). On retrouve cette séquence dans les glucosinolates (Figure 2), principaux éléments soufrés présents dans les brassicacées (Vanden Bussche et al. 2009).

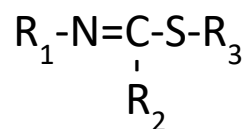
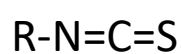


Figure 2: structure chimique commune aux ATS et exemple de la structure des glucosinolates

Le thiouracile est produit par condensation entre l'éthyl formylacetate et des thiourées. En 2000, sept compagnies en produisaient, six en Chine et une en Suisse. Son nom chimique est le 2,3-Dihydro-2-thioxo-4(1H)-pyrimidinone. Le thiouracile est légèrement soluble dans l'eau et l'éthanol, soluble dans l'acide fluorhydrique anhydre et les solutions alcalines. Les ATS ont en commun aussi un cycle pseudo aromatique qui rend possible la présence de nombreuses formes tautomériques, ce qui peut interférer dans la recherche par spectrométrie de masse des résidus d'ATS. Le thiouracile présente une douzaine de formes tautomériques différentes dont les principales sont décrites dans la figure 3 suivante (Boison 2012). Le thiouracile est une molécule amphotère, son faible poids moléculaire et sa forte polarité en font une molécule difficile à analyser. Il est difficile de la stabiliser dans le temps, ce qui pose des problèmes de conservation des échantillons lors des programmes d'analyse (Pinel et al. 2005).

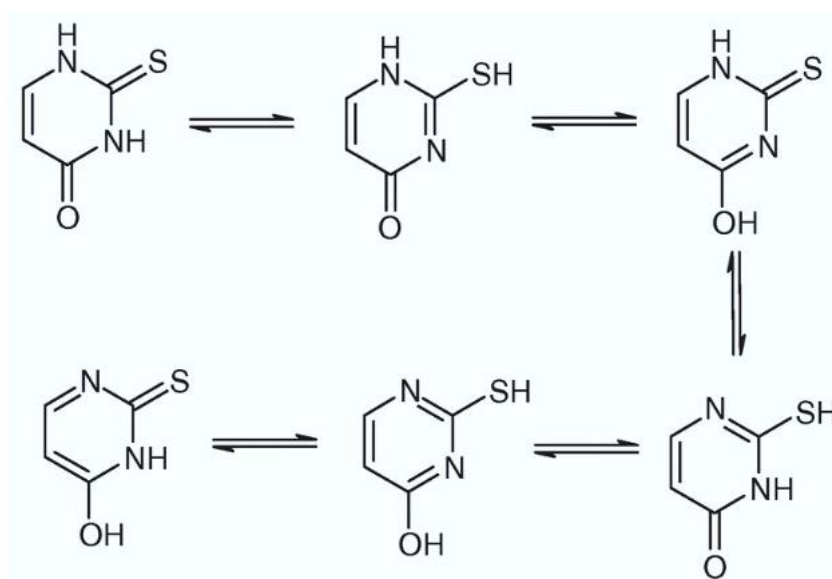


Figure 3 : les six formes tautomériques principales du 2-thiouracile (G. Pinel et al. 2006)

1.2 Pharmacocinétique

Le contrôle de l'utilisation des anabolisants passe par des méthodes analytiques qui permettent de détecter à partir de certaines teneurs les molécules d'intérêt. L'interprétation de ces résultats n'a de sens qu'au vu des propriétés pharmacocinétiques des molécules. La connaissance des profils de distribution, de métabolisation et d'élimination permet une meilleure interprétation des résultats. Outre le fait d'améliorer les connaissances sur le métabolisme de ces molécules, les études pharmacocinétiques des ATS aident à répondre à plusieurs questions. Pendant combien de temps peut-on détecter la molécule après administration ? Quelle est la matrice de choix pour trouver les plus fortes concentrations de résidus ? Peut-on retrouver des résidus dans les denrées ? (Heeremans et al. 1998) Par exemple, l'élimination du thiouracile est très rapide par voie urinaire, un résultat négatif d'un

échantillon d'urine ne veut pas forcément dire que l'animal n'a jamais reçu d'ATS au cours de sa vie mais que dans les 48 dernières heures il n'en a pas reçu.

On retrouve des données surtout pour l'homme et le rat mais peu sur les bovins et encore moins chez les ovins (Paris et al. 2006).

Absorption

Les ATS sont des médicaments dont la plupart sont administrables par voie orale. L'absorption par voie orale est excellente et rapide. Le temps entre l'administration et l'arrivée dans la circulation sanguine est rapide, elle est de l'ordre de 30min à 1h. La biodisponibilité, correspondant au rapport de la quantité absorbée par la voie d'administration donnée à celle obtenue par voie IV, est supérieure à 80 % (Paris et al. 2006).

Distribution

Des protéines plasmatiques assurent le transport de la plupart des ATS dans l'organisme. (Paris et al. 2006) Les thyrostatiques possèdent une demi-vie plasmatique faible. Les ATS s'accumulent préférentiellement dans la thyroïde, lieu où ces molécules vont agir. (DE BRABANDER 1984; Paris et al. 2006) Après une injection de 5 mg de thiouracile chez un rat, le rapport entre la concentration de thiouracile dans la thyroïde par rapport au sang était de 7,5 au bout de 10h et de 156 au bout de 48h. (International Agency for Research on Cancer 2001) Le thiouracile passe la barrière placentaire chez l'homme, le rat, le lapin et le chien (Site du Collège National de Pharmacologie Médicale 2022, International Agency for Research on Cancer 2001).

Métabolisation

Dans l'étude de Van Meulebroek et al (2018), l'étude du métabolome des échantillons d'urine d'animaux traités au thiouracile a permis d'identifier de nombreux métabolites du thiouracile. Les auteurs ont mis en lien ces métabolites avec le principe actif de base, visible sur la figure 4. On observe des métabolites de forte ressemblance avec le thiouracile et des liens logiques de métabolisation entre eux. Une certaine partie du thiouracile reste sous forme inchangée (Blokland et al. 2021; Van Meulebroek et al. 2018a). Des processus d'hydrogénation, de méthylation et d'autres réactions sont donc probables au sein de l'organisme.

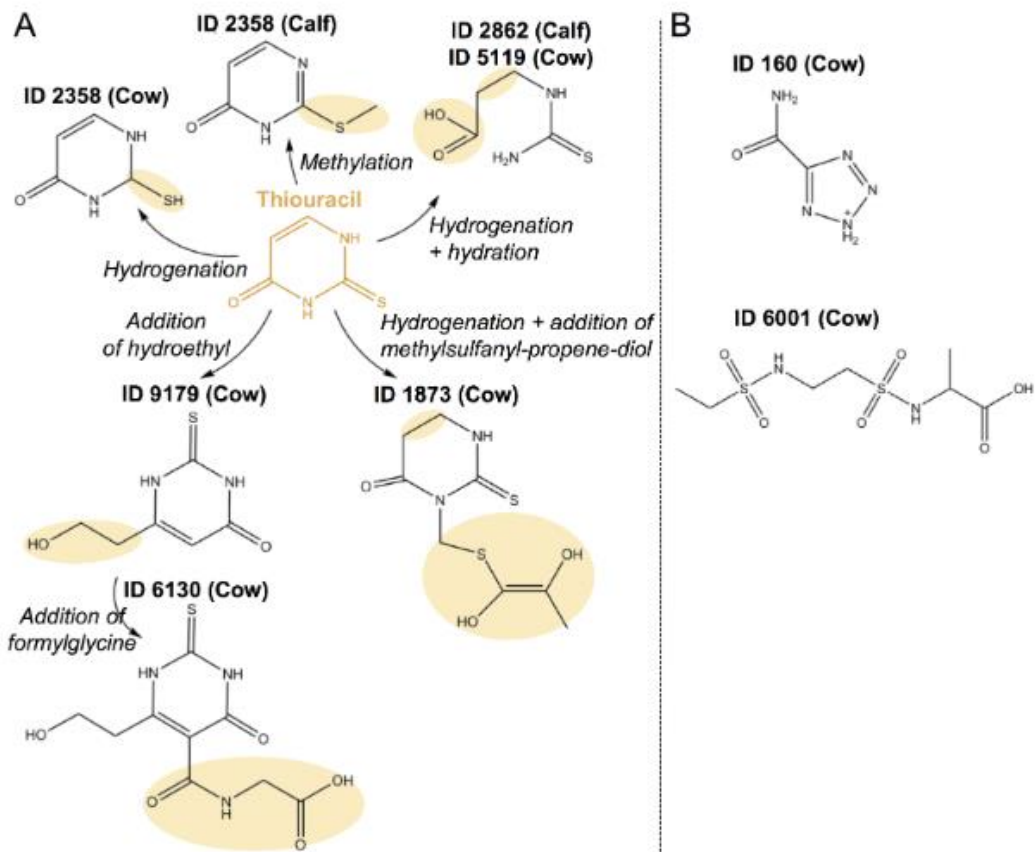


Figure 4 : structure chimique et possible lien métabolique avec le thiouracil administré. En A, les biomarqueurs présentant un lien direct avec le TU, en B, des molécules ne présentant pas de ressemblance avec le 2-thiouracile (Van Meulebroek et al. 2018a)

Excrétion

L'excrétion des ATS par l'organisme est au cœur du sujet du contrôle des résidus antithyroïdiens. En effet, la recherche de la matrice la plus pertinente et savoir quand l'excrétion est maximale permet d'orienter les prélèvements à réaliser pour un contrôle efficace d'un usage illégal de ces molécules.

La figure 5 montre la courbe d'excrétion de TU d'une génisse traitée au 2-thiouracile de T0 à T 14 avec deux capsules de 2,5 grammes de 2-thiouracile par jour. On observe bien une excrétion de 2-thiouracile par voie urinaire. Après administration, le 2-thiouracile est donc rapidement retrouvé dans l'urine.

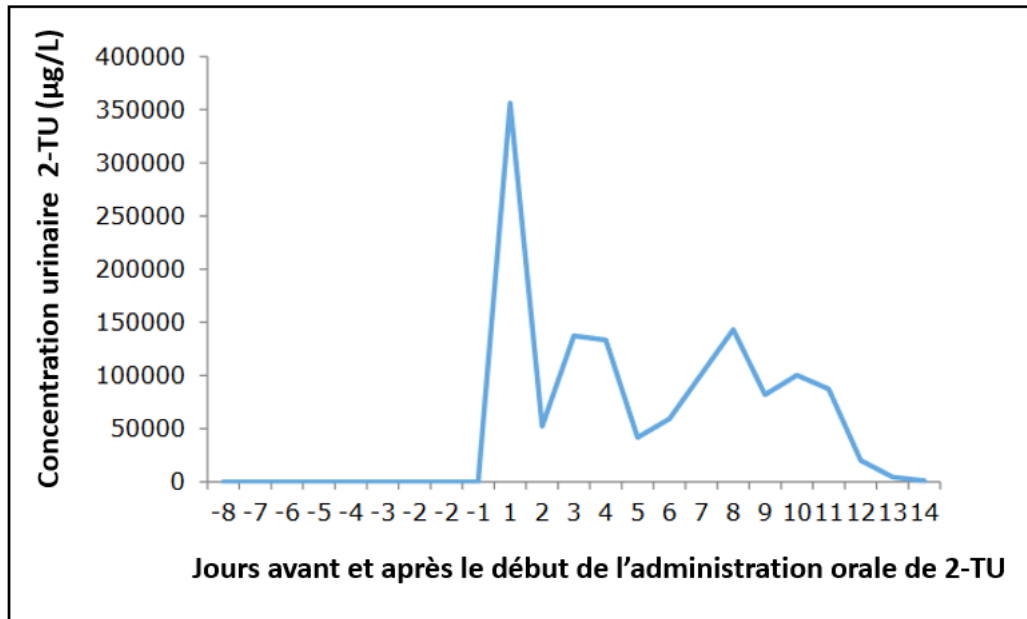


Figure 5 : courbe d'excrétion du 2-thiouracile (RIKILT Wageningen 2014)

Plusieurs métabolites du 2-thiouracile administré sont retrouvés dans l'urine. La figure 6 de l'étude de (Van Meulebroek et al. 2018b) montre les métabolites qu'on peut ainsi retrouver dans l'urine après un traitement au 2-Tu. Pour les veaux, l'expérience montre que le 2-TU d'origine exogène disparaît de l'urine après 48h après la dernière administration et 72 heures pour les vaches.

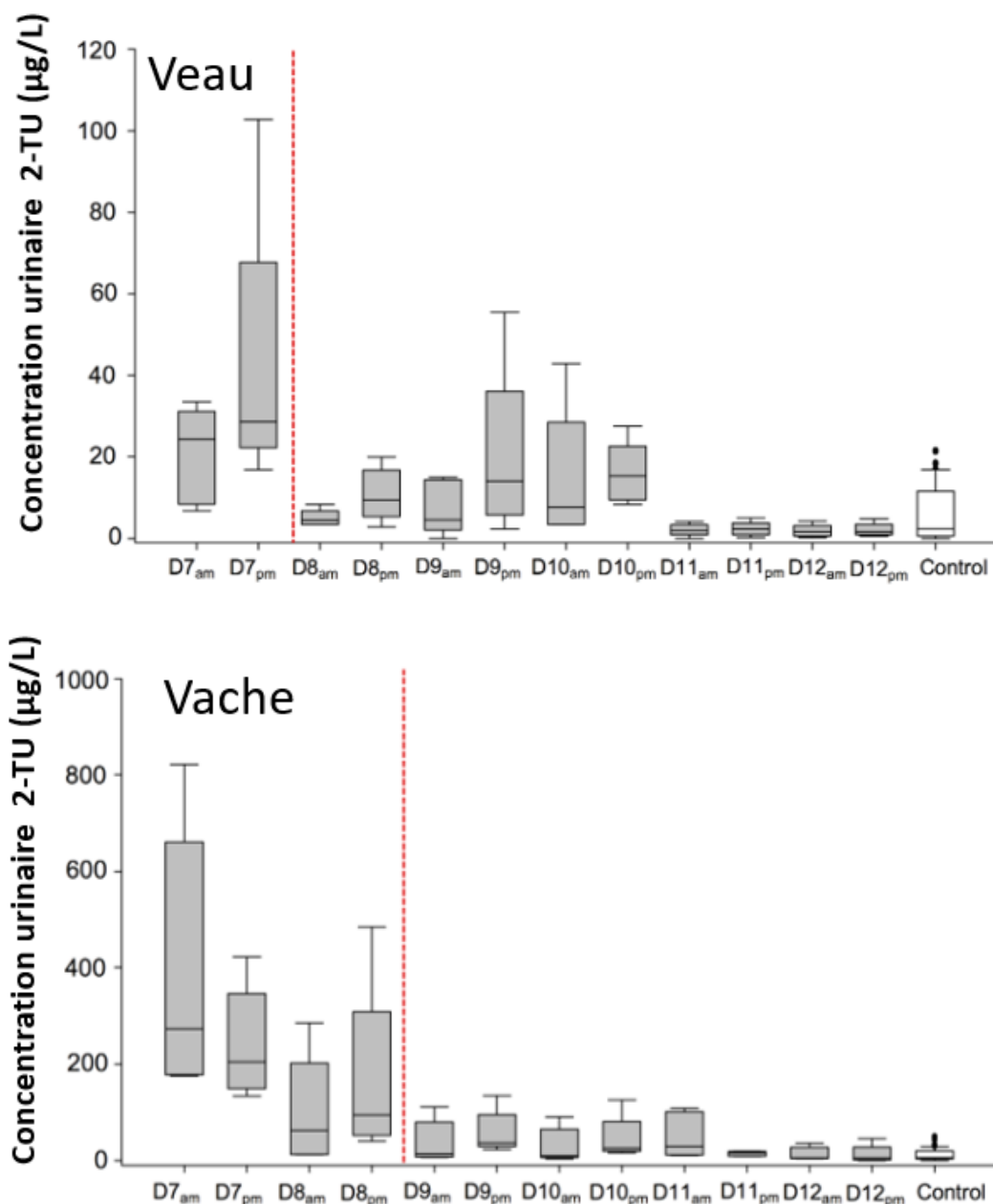


Figure 6 : boxplots des concentrations urinaires en TU post traitement. Ligne rouge : dernier résultat encore significativement différent de celui des contrôles.

Des études faites sur d'autres ATS nous permettent de comprendre l'excrétion du 2-thiouracile dans le temps. Pour ce qui est du PTU, chez le rat, on observe 71,7% d'élimination urinaire, 15,9% d'élimination biliaire et 2,3% d'élimination fécale (Lindsay et al. 1974). Dans l'étude de (Heeremans et al. 1998), du MTU a été administré chez des vaches et l'élimination a été étudiée. Les concentrations urinaires en MTU sont 50 à 100 fois supérieures au plasma et 250 à 500 fois supérieures aux concentrations dans le lait.

1.3 Hormones thyroïdiennes et mécanisme d'action des antithyroïdiens

1.3.1 Physiologie de la thyroïde (Shahid, Ashraf, Sharma 2024; Herve Julie 2024)

La thyroïde est une glande située à l'avant de l'encolure et à l'avant du cou pour l'homme, elle est positionnée de part et d'autre de la trachée. C'est une glande endocrine constituée d'un lobe gauche et d'un lobe droit rattachés par un isthme, elle est reliée à la circulation sanguine par les artères et veines thyroïdiennes crânielles et caudales. C'est par celle-ci que les hormones thyroïdiennes vont être libérées dans la circulation sanguine et ainsi agir sur l'organisme.

Au niveau histologique, elle est constituée d'une capsule et d'un parenchyme composé de multiples follicules. Ces follicules sont structurés par une couche de cellules folliculaires qui forme l'épithélium de ces follicules sphériques et délimitant une cavité centrale remplie de colloïde, intervenant dans la production et le stockage des hormones thyroïdiennes. Cette couche de cellules est composée majoritairement de thyrocytes, responsable de la synthèse des hormones thyroïdiennes.

La production des hormones thyroïdiennes suit un mécanisme qui est régulé et dépendant de nombreux facteurs. Le mécanisme de production des hormones thyroïdiennes est expliqué ci-dessous et schématisé dans la figure 7. La thyroïde est sous contrôle de la TSH (thyroestimuline hormone), elle est libérée par la glande pituitaire elle-même sous le contrôle de la TRH (thyrotropin releasing hormone) sécrétée par l'hypothalamus. Un rétrocontrôle négatif existe entre les hormones thyroïdiennes et la sécrétion de TSH et TRH. C'est-à-dire que si la concentration en hormone thyroïdienne est amenée à diminuer alors on assistera à une augmentation de la libération de TSH et TRH, induisant une plus grande activité de la thyroïde et donc la production d'hormone thyroïdienne si la thyroïde le permet.

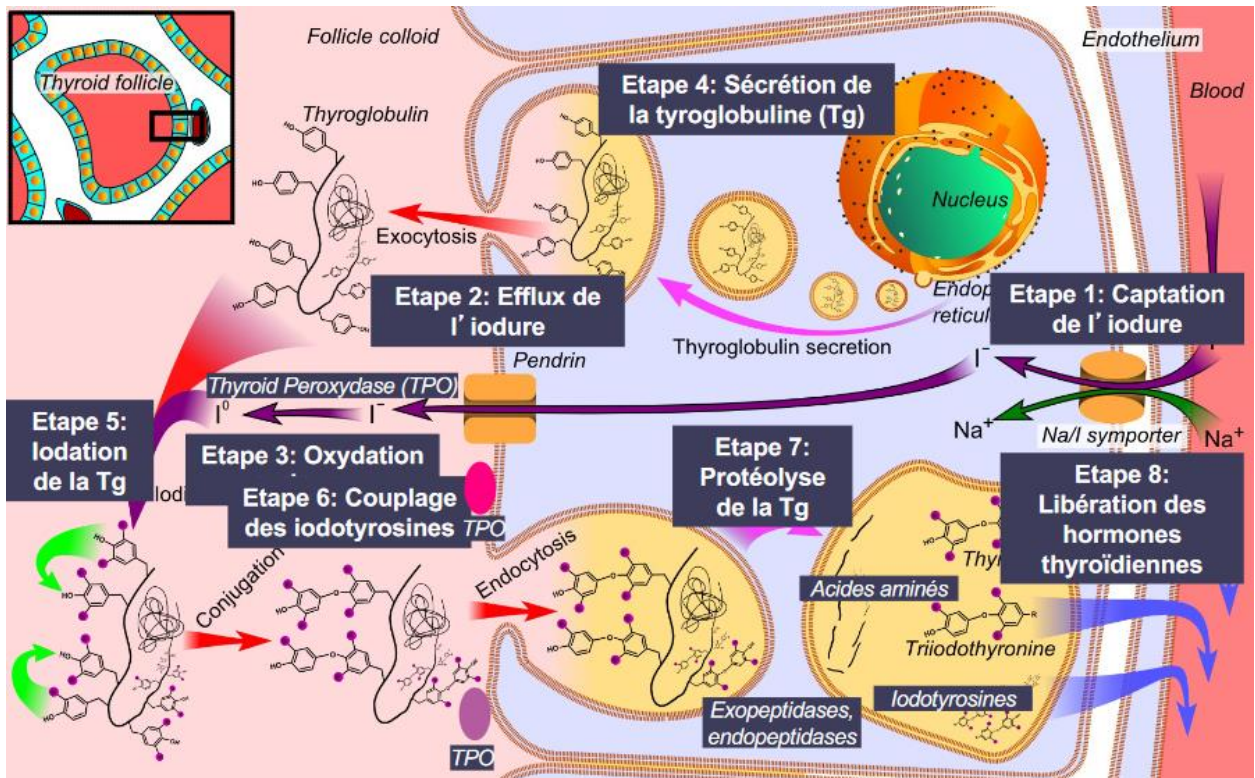


Figure 7 : synthèse des hormones thyroïdiennes (Boron, Boulpaep 2012; Herve Julie 2024)

L'iode est un élément central dans la production de ces hormones, l'apport majoritaire d'iode provient de l'alimentation, les thyrocytes captent l'iode de la circulation sanguine à l'aide d'un transporteur sodium iode sous contrôle de la TSH. L'iode une fois dans le colloïde subira une oxydation ($I^- \rightarrow I^0$) rendue possible par une enzyme, la TPO, thyroperoxydase. Cette enzyme est probablement la cible des ATS, en inhibant l'activité de la TPO, les ATS vont enrayer la production d'hormone thyroïdienne. (Paris et al. 2006)

La thyroglobuline, constituant majoritaire du colloïde, après iodation, permet la formation d'iodotyrosines sous forme de mono (MIT) ou di-iodotyrosines (DIT). La thyroperoxydase intervient une seconde fois dans le couplage des iodotyrosines entre elles pour former la triiodothyronine (T3) et la tétra-iodothyronine (T4). Après endocytose par les thyrocytes et protéolyse de la thyroglobuline (Tg) on aboutit à la formation des deux hormones T3 et T4 qui peuvent être libérées dans la circulation sanguine.

Dans la circulation, les hormones thyroïdiennes T3 et T4 sont majoritairement associées à la thyroxine binding protein (TBG), avec seulement 1 % de forme libre, T3 étant la forme active principale alors que T4, produite en plus grande quantité, agit comme une pro-hormone convertie en T3 par désiodation.

1.3.2 Effet physiologique des hormones thyroïdiennes sur l'organisme

1.3.2.1 Pharmacodynamie et effet sur l'organisme (Herve Julie 2024; Shahid, Ashraf, Sharma 2024)

Les hormones thyroïdiennes et surtout la T3, après circulation dans le sang et passage des membranes cytoplasmique et nucléaire *via* des transporteurs, vont venir se fixer sur des récepteurs nucléaires, situés dans le noyau des cellules cibles. Ces récepteurs possèdent un domaine de liaison à l'ADN et un domaine de fixation pour l'hormone. Classiquement, la fixation de T3 au récepteur va provoquer l'activation de gènes permettant la production de protéines. Ces protéines peuvent à leur tour activer ou inhiber d'autres gènes et donc modifier la présence d'autres protéines. Ce mécanisme d'action entraîne des réactions en chaîne et influe une multitude d'acteurs moléculaires et cellulaires.

Les hormones thyroïdiennes auront un effet sur le métabolisme, la thermogénèse, la croissance et la maturation des tissus et des effets systémiques. Les hormones thyroïdiennes augmentent le taux métabolique de base. La consommation d'oxygène et la thermogénèse augmentées en sont le témoin. On aura une augmentation de l'appétit, des sécrétions et de la mobilité digestive. Elles influent sur la synthèse de lipides et la lipolyse, stimulent le métabolisme des glucides, ont un effet anabolisant sur le métabolisme des protéines mais à fortes doses ont un effet catabolisant. On note aussi un rôle permissif sur les catécholamines avec un effet chronotrope et inotrope positif. Une tachycardie peut être observée en cas d'hyperthyroïdie. Chez l'enfant en croissance, il y a un effet synergique avec l'hormone de croissance (GH) qui a un effet sur la croissance osseuse mais aussi sur la maturation et la différenciation des muscles striés et du système nerveux. Les hormones thyroïdiennes ont un impact sur le système reproducteur avec des effets sur la fertilité, l'ovulation et la puberté.

1.3.3 Mécanismes de l'effet antithyroïdien des ATS

Le mécanisme exact de l'inhibition de l'activité de la thyroïde par les ATS n'est pas encore complètement élucidé. Une théorie souvent mise en lumière est l'inhibition de la thyroperoxydase (TPO) (Paris et al. 2006 ; Site du Collège National de Pharmacologie Médicale, 2022). Chez le rat, *in vivo*, le PTU inhibe l'activité de la TPO (Shiroozu et al. 1983). Les résultats de l'étude de Davidson et al. (1978) suggèrent que l'action initiale du 2-thiouracile, du propylthiouracile et du méthylmercaptoimidazole n'est pas d'agir comme inhibiteur de la TPO mais agit initialement en piégeant l'iode oxydé et bloque l'iodation de la thyroglobuline.

Une autre étude plus récente (Yoshihara et al. 2019), utilisant la technologie des puces à ADN, observe une régulation complexe des ATS sur l'activité de la thyroïde. Une modulation de l'expression de certains gènes des thyrocytes existe comme celui de l'iodotyrosine desiodase, enzyme responsable de la désiodation de la mono-iodotyrosine (MIT) et de la di-iodotyrosine (DIT).

Les ATS inhibent la synthèse hormonale mais n'empêchent pas la libération des hormones déjà formées et stockées. Un temps de latence existe avant l'apparition des effets (Paris et al. 2006).

1.4 Utilisations thérapeutiques des antithyroïdiens

1.4.1 Médecine humaine

Le 2-thiouracile a commencé à être utilisé en 1943, ce fut le premier thionamide utilisé comme antithyroïdien. En médecine humaine, son utilisation a été stoppée à cause de ces nombreuses réactions secondaires, laissant place à des molécules moins toxiques telles que le propylthiouracile ou le methimazole (International Agency for Research on Cancer 2001). Les ATS sont encore utilisés aujourd'hui pour traiter l'hyperthyroïdie, y compris la maladie de Basedow, maladie auto-immune affectant la thyroïde. Elle peut être en partie traitée par l'utilisation de carbimazole ou de propylthiouracyle pour gérer les symptômes tels que la tachycardie, l'augmentation du métabolisme, l'amaigrissement, l'accélération du transit et l'agitation (Site du Collège National de Pharmacologie Médicale 2022).

1.4.2 Médecine animale

En médecine vétérinaire, les ATS sont utilisés pour traiter des maladies chez les animaux domestiques comme le chat et le chien. L'hyperthyroïdie du chat, résultant d'une hyperplasie, d'un adénome de la thyroïde ou plus rarement d'un adénocarcinome thyroïdien peut être traitée avec du méthimazole et son précurseur, le carbimazole (Sénécat 2023). Le thiouracile et le propylthiouracile ne sont plus utilisés dans la médecine vétérinaire (Kampmann, Hansen 1981).

1.5 Utilisations en tant que promoteurs de croissance

L'utilisation de promoteurs de croissance, courante à partir des années 1960, n'a cessé d'évoluer. Les procédés de fraude ont changé avec les techniques scientifiques et les réglementations. Les enjeux économiques de rentabilité ont rendu la pratique intéressante pour les acteurs de la filière viande (Courtheyn et al. 2002; Ferrando 1973; CESBRON 2017). De nombreux pays, leaders en termes d'élevage, autorisent l'utilisation d'implants contenant des stéroïdes comme les Etats-Unis, le Canada, la Chine, l'Australie et l'Argentine (Skoupá, Šťastný, Sládek 2022).

Dans les années 1960, le thiouracile et ses analogues dont le MTU figuraient dans la liste des promoteurs de croissance et d'engraissement pour les animaux de production comme le porc et le bétail. Cependant, la présence d'anabolisants comme les œstrogènes, les androgènes et la progestérone ont fait concurrence à l'utilisation des ATS au vu de leur efficacité. Cependant, l'interdiction en Europe, en 1980, des stéroïdes a provoqué un retour sur le devant de la scène des ATS. Dans les années 80, de nouveaux cas de fraude aux ATS sur bovins ont été identifiés. L'affaire des bœufs au MTU a fait réagir les associations de consommateurs et a permis de mettre en lumière cette pratique. (Mercier 1983). En 1982, des jeunes bovins ayant une croissance rapide et présentant une hypertrophie de la thyroïde ont été trouvés dans des abattoirs. La suspicion d'utilisation d'ATS avait été confirmée. Dans cette même période, la

présence de thiouracile avait été détectée dans plusieurs régions de France. (Comsa et al. 1982)

En 1983, une autre enquête de l'Académie française vétérinaire montre un emploi répandu de MTU en particulier dans le Nord et l'Ouest. Suite à ces enquêtes, des aliments contenant du MTU ont été retirés. Les substances antithyroïdiennes les plus utilisées à des fins d'engraissement sont le méthyl-2-thiouracile (MTU) puis le 2-thiouracile, le propyl-2-thiouracile, le benzyl-2-thiouracile et le méthimazole (Pochard 1983). La plupart du temps, les ATS étaient incorporés dans l'aliment, l'éleveur recevait l'aliment déjà supplémenté. (Raynaud, Ruckebusch 1987). C'est ainsi qu'un aliment supplémenté en ATS, commercialisé sous le nom « aliment 300 », permettait à l'éleveur de gagner 300 francs de plus par bovins avec l'utilisation de ce produit. (Mercier 1983)

La consommation de viande contaminée par du méthimazole en Espagne, dans les années 90, a peut-être participé à augmenter l'incidence d'aplasie cutanée chez les nouveau-nés selon Martínez-Frías et al. (1992).

En 2006, dans le Sud-Ouest, des traces d'ATS sont détectées dans un élevage. 1800 veaux d'un cheptel sont concernés par des procédures d'abattage. L'intégrateur fournissait une ration supplémentée avec du 2-thiouracile pour augmenter la croissance des veaux. Les plans de surveillance orchestrés par la DGAL avaient permis de mettre en lumière ces actions illégales (PONS 2006).

Le laboratoire de référence de Bilthoven a attiré l'attention sur l'arrivée d'une nouvelle molécule antithyroïdienne, le mercaptobenzimidazole. Cette dernière n'était donc pas encore incluse dans les programmes de contrôle car son usage n'avait pas été identifié (Courtheyn et al. 2002).

Pour le MTU, d'après Mercier (1983), la posologie optimum chez les bovins est de 1,25 g de MTU pour 100kg de poids vif. Les études divergent vis-à-vis de la durée du traitement mais le plus fréquemment il était conseillé plus de quatre semaines de traitement et un envoi rapide à l'abattoir pour ne pas perdre le gain. La dose journalière de cinq grammes par animal pendant 30 jours était répandue selon Courtheyn et al. 2002.

1.6 Effets des thyrostatiques sur la productivité des principales espèces de production

1.6.1 L'effet « anabolisant » des thyrostatiques

Un des premiers points qui permet de comprendre le gain de poids vifs de l'animal est l'augmentation de la taille du tube digestif. Les hormones thyroïdiennes facilitent l'action des catécholamines qui agissent sur la motricité du tube digestif. L'usage d'ATS va freiner l'activité des catécholamines sur le tube digestif et un ralentissement de la vidange gastrique et du péristaltisme est observé (Pohlschmidt, Forscher 1979). D'après Frens (1949), en

s'intéressant au poids des intestins et du rumen, 60% à 70% du gain de poids serait dû à cette diminution de tonus digestif. L'excrétion de fèces pendant le transport est diminuée, ainsi les animaux arrivent plus lourds à l'abattoir (Mercier 1983).

Une diminution des hormones thyroïdiennes peut réduire l'assimilation énergétique de la cellule. Cet évènement impacte l'équilibre osmotique de l'organisme, provoquant une perturbation de l'activité rénale qui a pour résultante une rétention d'eau dans l'organisme. De plus, une diminution de l'activité hyaluronidase est observée, faisant accroître la taille des mucoprotéines conjonctives, ce qui permet le plus grand stockage de l'eau dans l'organisme (Pohlschmidt, Forschner 1979).

On peut se questionner sur la véritable dénomination d'anabolisant ou promoteur de croissance pour les ATS. Un anabolisant est une substance susceptible de favoriser l'incorporation de l'azote dans des protéines. Les anabolisants vont accélérer la biosynthèse des protéines tissulaires avec comme conséquence, le développement musculaire (Ferrando 1973; Prévost et al. 2014). Les nombreux effets des ATS ne vont pas dans ce sens car le gain de poids majoritaire ne provient pas de la prise de masse musculaire mais d'une stase digestive et d'une rétention d'eau dans les tissus.

Le gain de poids avant abattage et la meilleure efficacité alimentaire permettent à l'éleveur de gagner en rentabilité. C'est pourquoi l'usage illégal des ATS pouvait être pratiqué par certains acteurs de cette filière.

On peut noter que peu d'études ont été faites sur l'impact de l'usage de thiouracile sur la productivité des ovins. La littérature la plus abondante dans ce domaine est abordée pour l'usage du méthylthiouracile pour les bovins. Etant donné le caractère illicite de cette pratique, peu de récentes études existent sur les potentiels effets zootechniques de l'usage des ATS sur les animaux d'élevages.

L'élevage d'ovin est soumis à beaucoup de problématique : dépeuplement des zones d'élevages, faible rentabilité, peu d'amélioration technique, marché économique difficile et une forte concurrence avec d'autres pays importateurs mondiaux (Theodoridis et al. 2021). Cette faible rentabilité a pu motiver certains acteurs de cette filière à utiliser des anabolisants et c'est pourquoi il est nécessaire de surveiller leurs usages chez les ovins.

1.6.2 Effet chez les autres espèces de production

Beeson et al en 1947 se sont intéressés à l'effet de l'ajout de thiouracile dans la ration de bœuf. L'administration de thiouracile n'a pas affecté l'ingestion alimentaire des animaux, le GMQ a été légèrement augmenté pour certains lots mais globalement le thiouracile n'a pas eu d'impact sur la croissance des animaux. Le poids de la thyroïde est significativement augmenté.

Le MTU, un autre ATS, augmente de façon significative le gain moyen quotidien des bovins. De nombreuses études ont regardé le GMQ gagné par l'usage de MTU pendant une période allant de 4 à 6 semaines. Ainsi, on observe un gain augmenté de 600 g/J à 1100 kg/J pour les animaux traités au MTU par rapport aux animaux contrôles des études (Tangl, Kunffy, Farkas 1967; Frens

1949; ISAKOV, LAZIC 1968). La fin de la période de traitement doit coïncider avec l'abattoir car une perte du gain de poids obtenu par l'usage des ATS est observée dans les semaines après l'arrêt de l'administration (Tangl, Kunffy, Farkas 1967).

Chez le porc et la volaille, on note peu d'effet sur le gain de productivité. Chez ces deux espèces, Acevedo, en 1948, pour le porc et Blakely et Anderson, en 1949, pour des volailles ont même noté une baisse du GMQ suite à une période de traitement au thiouracile (Acevedo et al. 1948; Blakely, Anderson 1949).

1.6.3 Effet chez l'ovin

Peu d'études existent sur l'effet du thiouracile sur la croissance des ovins. Andrews et al, en 1947, montrent que l'ajout de thiouracile dans l'alimentation des agneaux n'entraîne pas d'augmentation de croissance, on assiste même à une légère diminution des GMQ. Le thiouracile semble diminuer l'ingestion alimentaire des agneaux.

En prenant un autre ATS, d'après (Mercier, 1983), l'usage de MTU chez les ovins n'a pas de réel intérêt agronomique. Un des effets qui pourrait être exploitable par l'éleveur est la réduction de la consommation d'aliment engendrée par les ATS.

1.7. Impact pour le consommateur

1.7.1 Risque lié à l'utilisation des antithyroïdiens en élevage

L'IARC, l'international agency for research on cancer, dans le volume 79 sur le thème agents thyrotropic, a publié une série de fiches sur le potentiel effet cancérigène du thiouracile et des molécules apparentées (methimazole, methylthiouracile, propylthiouracile et thiouracile). Une première évaluation avait été réalisée en 1974, reconduite en 2001. D'après l'évaluation, il n'existe pas de preuves suffisantes du caractère cancérigène du thiouracile chez l'homme mais il existe suffisamment de preuves de l'effet cancérigène chez les animaux de laboratoire. Par conséquent, l'évaluation globale de l'IARC classe le thiouracile dans le groupe 2B. Ce groupe rassemble des agents potentiellement cancérigènes pour l'homme. Il en est de même pour le methylthiouracile et le propylthiouracile (International Agency for Research on Cancer 2001).

La toxicité des ATS peut aller d'effets mineurs comme de l'urticaire, des vomissements, de la léthargie à des effets graves : lésions hépatiques et troubles hématologiques comme de l'agranulocytose (Nambiar et al. 2014). L'effet toxique peut être encore plus dangereux pour des jeunes personnes en croissance comme les nourrissons. Cette population est très vulnérable car ils possèdent un taux de consommation alimentaire par unité de poids élevé ce qui les rendent encore plus exposés aux résidus d'ATS. Le besoin de vérification de l'absence de ces résidus est donc primordial. (Gentili et al. 2016) A noter de plus que la cuisson ne semble pas diminuer la présence des résidus d'ATS comme le montre (DE BRABANDER 1984). Les résidus sont même retrouvés plus concentrés après la cuisson dû à la perte en eau de la

viande. Par ailleurs, une étude en Espagne montre que la consommation de viande contenant des résidus d'ATS par des femmes enceintes pourrait être en lien avec la naissance de nourrissons présentant une aplasie cutanée congénitale (Sachs et al. 2016; Martínez-Frías et al. 1992).

C'est pour ces raisons que le conseil de l'Union Européenne a interdit l'usage des ATS à des fins d'engraissement (*E.C. Council directive 81/602*) et place les agents thyroïdiens dans le groupe A de l'annexe 1 de la directive *96/23/CE*.

1.7.2 Impact sur la carcasse et la qualité de la viande

D'après Tangl et al (1967), l'usage de MTU améliore la qualité de la carcasse et la saveur de la viande. De plus, l'organisation de la graisse dans la viande est plus uniforme. Andrews et al. (1947), montrent que dans les groupes d'agneaux traités au thiouracile il y a significativement un plus grand nombre de carcasses de qualité supérieure que dans le groupe témoin.

La présence accrue d'eau entraîne une consistance des masses musculaires plus molle. Les muscles ont tendance à s'affaisser et une flaque d'eau, liquide séro-hémorragique, est parfois constatée à l'abattoir sous les carcasses pendant le ressuyage. Une augmentation de la teneur en graisse est aussi notée. Le consommateur est souvent lésé car la viande est vendue au même prix alors que la viande d'animaux traités contient plus d'eau. Globalement, il n'y a pas de fort changement des caractéristiques macroscopiques de la viande (Courtheyn et al. 2002; Vanden Bussche et al. 2009; DE BRABANDER 1984).

2. Réglementation des substances antithyroïdiennes

2.1. Historique et acteurs de la réglementation

La réglementation qui entre en vigueur en France pour l'utilisation des substances thyrostatiques provient d'un cadre national et européen. C'est ce cadre réglementaire qui permet de garantir aux consommateurs l'innocuité des aliments descendant des productions animales mais aussi de garder un contrôle éthique sur les méthodes d'élevages des animaux de production.

En 1981, l'Union Européenne rédige une directive concernant l'interdiction de certaines substances à effet hormonal et substances à effet thyrostatique (Journal officiel des Communautés européennes 1981). Cette directive considère que certaines substances thyrostatiques sont susceptibles d'être un danger pour le consommateur et affectent la qualité de la viande. En cela, elle interdit l'administration, par n'importe quel moyen, de thyrostatiques à des animaux, la mise sur le marché d'animaux et de leur produit dont on a administré ces substances.

La directive *96/23/CE* s'inscrivait dans la volonté d'uniformiser la recherche et le contrôle des thyrostatiques. Pour lutter efficacement contre ces fraudes, un système de plans de surveillance pour la recherche des résidus ou substances est initié, ce sont les PSPC, les plans

de surveillance et de contrôle. Ces plans définissent les échantillonnages à réaliser selon les espèces. L'échantillonnage est effectué tout au long de la filière d'élevage et du processus de production des denrées animales. En cas de suspicion de fraude, des enquêtes seront initiées pour clarifier et juger la fraude. Les espèces concernées par ces contrôles sont les bovins, ovins, caprins, porcins, équidés et reptile (*règlement délégué 2022/1644*). Le nombre minimal d'échantillons pour les ovins et caprins représentent au moins 0,01% des animaux abattus de ces espèces (*règlement d'exécution 2022/1646*).

Pour assurer la bonne implantation de la directive 96/23/CE, le texte 2002/657/CE établit les critères de performances requis et propose une ligne directrice à suivre pour les techniques d'analyses. Le règlement 2021/808/EU, entré en vigueur en juin 2021, vient remplacer la directive 2002/657/EC. Les laboratoires ont cinq ans pour se mettre à jour des nouvelles directives. La méthode utilisée durant cette thèse suit la directive 2002/657/EC. Une mise à jour de cette méthode est en cours afin de répondre au nouveau règlement mais sans modification du protocole analytique (*2021/808/UE*). Les paramètres qui doivent être évalués au cours de la procédure de validation sont la sélectivité, la spécificité, la linéarité, la justesse, la récupération, l'applicabilité, la robustesse, la stabilité, la répétabilité, la reproductibilité et les limites de décision ($CC\alpha$) et de détection ($CC\beta$).

En 2017, le parlement et le conseil européen rédigent un texte pour remettre à jour la réglementation concernant le contrôle des antithyroïdiens et des autres substances soumises à un contrôle concernant la production animale (*RÈGLEMENT UE 2017-625*). Le laboratoire WFSR, anciennement nommé RIKILT, (Wageningen Food Safety Research, Pays-Bas) est l'EURL pour les substances thyrostatiques. Ce laboratoire de référence permet l'évolution, la recherche, la validation et la communication sur les nouvelles méthodes de recherche.

L'EU-RL met à disposition des rapports, un de 2014 et un de 2022. Ces rapports n'ont pas de caractère officiel mais ils donnent des informations pour les acteurs du contrôle des substances dans les différents pays de l'Europe (RIKILT Wageningen 2014; *EURL MMPR guidance paper* 2020; Wageningen Food Safety Research 2022).

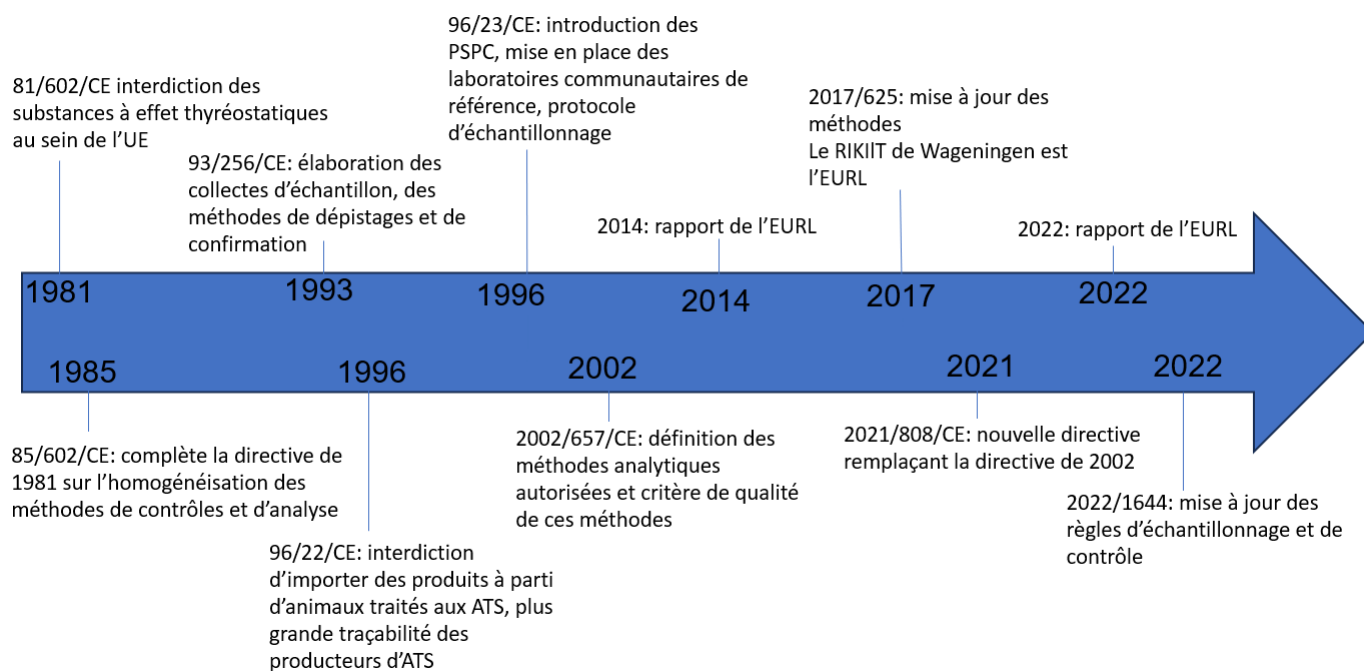


Figure 8 : chronologie de la réglementation européenne des ATS(Council directive 81/602/EC 1981; 85/602/CEE 1985; 93/256/CEE 1993; Directive 96/22/CE; 96/23/CE 1996; 2002/657/CE 2002; RÈGLEMENT UE 2017-625 2017; 2021/808/UE 2021; règlement délégué 2022/1644 2022)

2.2 La réglementation en France

Les directives européennes pour être effectives en France doivent être transposées en droit national. Les réglementations concernant la santé publique et la détection des fraudes sont codifiées par le code de la santé publique et le code rural et de la pêche maritime. La responsabilité du contrôle des substances comme les ATS dans les denrées d'origine animale est placée sous la responsabilité de la direction générale de l'alimentation (DGAL), faisant partie du ministère de l'agriculture. Pour ce qui est de l'alimentation animale et des produits transformés, c'est la direction générale de la consommation, de la concurrence et de la répression des fraudes qui en a la responsabilité. La DGAL organise un réseau de laboratoires nationaux de référence (LNR) qui permet la gestion des plans de surveillance et de contrôle dans les élevages. Les LNR sont à la tête d'un réseau de laboratoires pour les analyses de routine. Ces laboratoires comme les laboratoires départementaux sont mandatés par les DDPP et DDESTPP. Les LNR participent à des missions de recherche dans une démarche d'amélioration continue, dont cette thèse s'inscrit.

Les laboratoires doivent être accrédités pour exercer leur activité. Ils se soumettent au respect des normes iso et des contrôles réguliers leur permettent de garder cette accréditation (audit cofrac). Le respect de la norme ISO 17025 permet de s'assurer de la fiabilité des résultats et garantit le système d'assurance qualité.

2.3 Les plans actuels de surveillance et de contrôle

Les états membres, de par la directive 96/23/CE, ont mis en place un plan national de surveillance des résidus en suivant les lignes directrices données par les directives européennes. Depuis 2007, les données des campagnes de détection des résidus d'anabolisants sont recueillies par l'EFSA, Autorité Européenne de Sécurité Alimentaire. L'EFSA rédige des rapports annuels sur les résultats de dépistage des substances surveillées dans les produits animaux et les animaux. Pour l'année 2022, le rapport signale que la majorité des pays respecte les critères d'échantillonnages fixés par la directive 96/23/CE et 97/747/CE.

En 2022, pour le groupe A2, 21 échantillons sont revenus positifs dans sept pays. 19 bovins dépassaient le seuil de thiouracile et deux porcs au Portugal dépassaient le seuil en 6-méthylthiouracile. 197 échantillons de chèvres et moutons ont été analysés, aucun n'est ressorti positif au ATS (European Food Safety Authority, Salvatore, Ferrer 2024).

Tableau I: résultats des plans de contrôle chez les bovins et ovins ; données recueillies des rapports de l'EFSA de 2007 à 2022 (Pour 2022 : European Food Safety Authority, Salvatore, Ferrer 2024)

Année	Bovin	Mouton et chèvre
2022	19/5309 (19 TU et 2 MTU)	0/197
2021	30/5353 (30 TU)	2/197(TU)
2020	29/5304 (29 TU)	4/201 (TU)
2019	50/4728 (50 TU)	2/270(TU)
2018	35/4119 (35 TU et 2 MTU)	6/206 (TU)
2017	32/4527 (TU)	2/205 (TU)
2016	34/3956	2/215
2015	56/4403	1/270
2014	48/4788 (TU)	2/273 (TU)
2013	62/5151 (TU)	1/274 (TU)
2012	29/5478 (TU)	1/259 (TU)
2011	50/5539 (TU)	9/246 (TU)
2010	42/5552 (TU et ethylthiouracile)	2/243 (TU)
2009	27/5539 (TU)	0/280
2008	179/4802 (TU)	1/222 (TU)
2007	62/5361 (TU)	0/357 (TU)

Depuis 2007, les plans de contrôle permettent de maintenir un état de vigilance vis-à-vis de l'utilisation de certaines substances. Pour ce qui est des ATS, chaque année on retrouve des échantillons suspects sans qu'il s'agisse forcément de fraude. Des enquêtes sont réalisées et des tests de confirmation sont effectués pour s'assurer du caractère illégal ou non de ces suspicions (Tableau I).

3. Avancée des recherches scientifiques

3.1 Observation et compréhension de la présence de 2-thiouracile chez des animaux non traités

Les données récoltées dans le cadre des plans de recherche annuels exigés par la directive 96/23/CE ont permis de mieux caractériser l'occurrence naturelle d'ATS dans les populations animales et d'affiner les stratégies de détection et de contrôle (Woźniak et al. 2018; Wozniak et al. 2012; Le Bizec et al. 2011; Wauters et al. 2015). Le tableau II rend compte des résultats des études sur l'occurrence du 2-thiouracile.

Tableau II : concentrations urinaires de 2-thiouracile d'animaux de production (d'après Le Bizec et al. 2011; Wauters et al. 2015)

Espèce	Bovin (Le Bizec et al. 2011)	Porc (Le Bizec et al. 2011)	Ovin (Le Bizec et al. 2011)	Bélier (Le Bizec et al. 2011)	Brebis (Le Bizec et al. 2011)	Petit ruminant (Wauters et al. 2015)	Bovin (Wauters et al. 2015)
Nombre d'individus	1098	201	26	13	6	85	3894
Moyenne 2-TU urinaire (µg/L)	1,4	0,9	3,3	3,5	1,3	1,6	1,7
Médiane 2-TU urinaire (µg/L)	0,3	0,5	2,2	1,7	1,0	0	0
Max 2-TU urinaire (µg/L)	22,5	7	14,3	14,3	3,0	27	145,00
95 % centile 2-TU urinaire (µg/L)	6,2	2,9	12,9	14,3	3,0	7,3	8,1

Ces données mettent en valeur la présence naturelle dans les populations de 2-thiouracile. Le Bizec et al. (2011) décrivent aussi une hétérogénéité des concentrations de thiouracile retrouvée entre les groupes de bovins mâles, femelles et jeunes. Les teneurs en thiouracile urinaire sont les plus fortes dans le groupe des veaux mâles de plus de 6 mois. Le graphique suivant montre la fréquence de distribution du thiouracile dans des échantillons d'urine de veau.

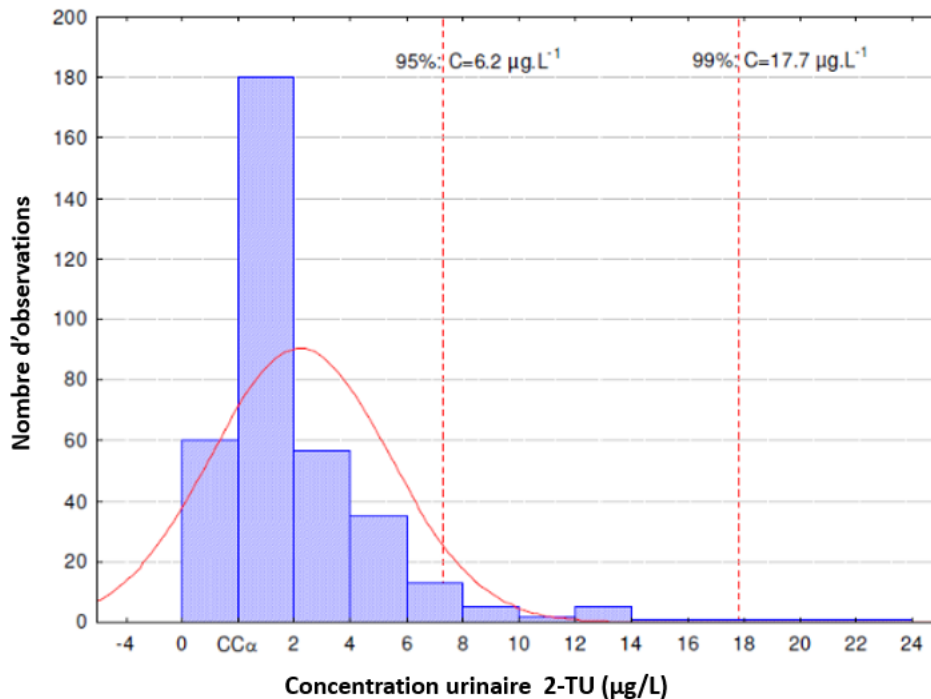


Figure 9 : fréquence de distribution du thiouracil dans des échantillons d'urine de veau (d'après Le Bizec et al. 2011; Wageningen Food Safety Research 2022)

Différentes études (Le Bizec et al. 2011; Wauters et al. 2015) ont mis en évidence la présence de 2-thiouracile dans les populations d'animaux de production. Les concentrations trouvées sont souvent faibles $< 10 \mu\text{g/L}$ mais parfois elles dépassent les seuils européens de $10 \mu\text{g/L}$. Etant donné la grande proportion d'animaux présentant de faibles concentrations de 2-thiouracile et qu'une administration illégale semble peu probable au vu du nombre d'animaux trouvés et de l'interdiction de cette pratique depuis plus de 40 ans, on peut qualifier cette présence de « naturelle ».

Cela nous amène à nous interroger sur le pourquoi de la présence du 2-thiouracile dans les urines des animaux d'élevage. Une cause depuis longtemps suspectée est le rôle des brassicacées dans la formation endogène de 2-thiouracile. (Kennedy, Purves 1941; Kiebooms 2014). En effet, les auteurs avaient observé l'effet goitrogène des graines de brassicacée sur la thyroïde des rats (Kennedy, Purves 1941).

Pinel et al. (2006) ont pu établir une corrélation entre la présence de 2-thiouracile et une alimentation à base de brassicacée.

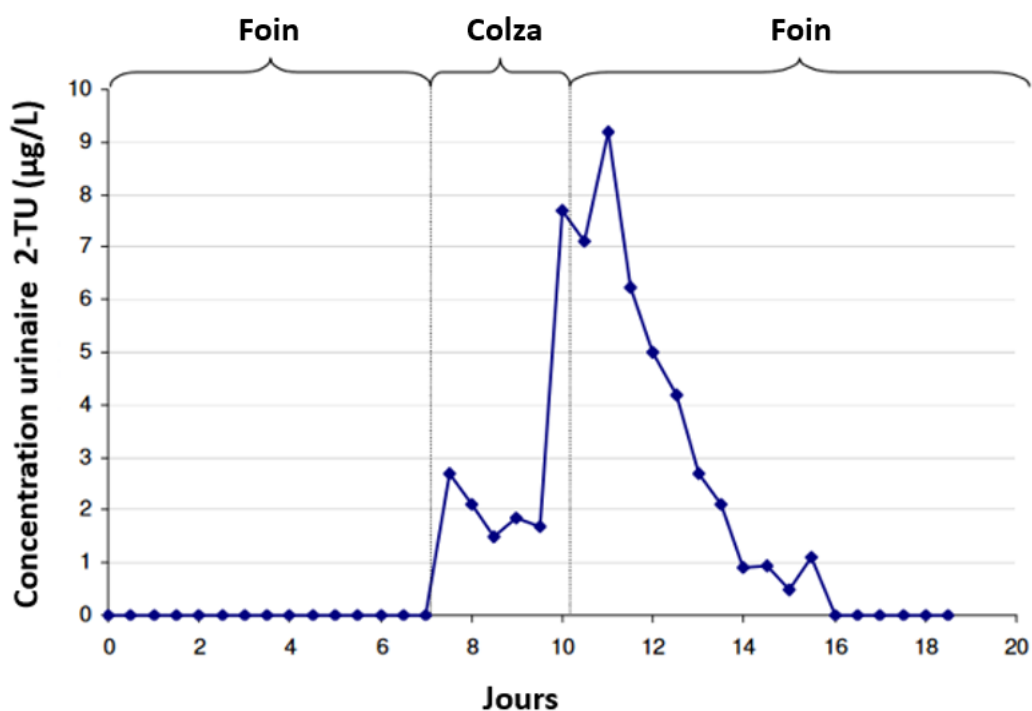


Figure 10 : élimination urinaire de 2-thiouracile, Pinel et al. (2006).

L'introduction de brassicacées dans la ration coïncide avec la présence de 2-thiouracile dans l'urine. Les auteurs n'ont pas mis en évidence la présence de 2-thiouracile dans les feuilles de chou ou le tourteau de colza. Le 2-thiouracile ne provient donc pas directement de la plante mais des mécanismes permettent après ingestion la formation endogène de 2-thiouracile.

3.2 Les brassicacées, compréhension dans la présence endogène de 2-thiouracile

Les brassicacées sont une famille de plantes anciennement appelée crucifères. Les membres les plus connus sont le colza, le chou, le navet, la moutarde. Le colza est un des membres les plus courants des brassicacées, considéré comme un oléagineux, il est utile dans la production d'huile destinée à la consommation humaine ou la production de biocarburant. On retrouve le colza aussi sous forme de tourteau qu'on retrouve fréquemment dans la ration des animaux de production en France. Un des atouts du tourteau est sa richesse en matière protéique. En 2022, la France a produit 4,5 millions de tonnes de colza. (France 2024; Franzke et al. 2011)

La famille des brassicacées est connue depuis longtemps pour contenir des substances avec une activité antithyroïdienne. Cette famille de plantes contient des composés sulfurés responsables de l'activité goitrogène (Zukalová, Vašák 2002; Bussche et al. 2011). Ces composés appelés glucosinolate ou thioglucoside, sont biologiquement inactifs. Une hydrolyse, rendue possible par une enzyme, la myrosinase, permet la transformation de ces thioglucosides en plusieurs molécules : le glucose, des sulfates, des thiocyanates, des composés soufrés et des isothiocyanates. Le résultat de l'hydrolyse des glucosinolates est donné dans l'annexe 1. Certains de ces produits de réaction possèdent une activité goitrogène (Vanden Bussche et al. 2009). L'Oxazolidine-2-thione ou VOT, appelé goitrin possède une

activité antithyroïdienne, l'équivalent de 133% du propylthiouracile (Brabander, Verbeke 1982). On peut même retrouver une certaine quantité de VOT dans le lait, ce qui pour les enfants qui consomment beaucoup de lait, représente un danger pour leur santé (Courtheyn et al. 2002).

Du 2-thiouracile est détectable dans le tourteau après une étape d'incubation et en plus grande quantité lorsque de la myrosinase est ajoutée alors qu'il n'est pas détectable sans cette étape d'incubation. Le 2-thiouracile semble suivre une voie de synthèse similaire à l'oxazolidine-2-thione et aux thiocyanates, eux-mêmes des antithyroïdiens naturels. Ceci donne une explication de la présence en faible concentration de 2-thiouracile dans l'urine des animaux de production (Bussche et al. 2011). Cependant, les brassicacées ne semblent pas être le seul facteur expliquant la présence endogène de TU.

Des études se sont donc penchées sur le rôle du tube digestif dans la formation de 2-thiouracile. Kiebooms et al. (2012) se sont intéressés aux mécanismes microbiologiques et moléculaires impliqués. En mettant en contact des matrices élaborées à partir de brassicacées et le contenu du tube digestif, les auteurs ont pu constater que le TU est principalement formé dans le côlon et, dans une moindre mesure, dans le rumen des bovins, il est moins retrouvé dans les intestins et l'estomac. La colonisation bactérienne semble donc jouer un rôle important dans cette présence. Après élimination des bactéries par filtration, du TU était encore présent, indiquant un rôle extracellulaire des molécules. Une stérilisation rapide réduisait la concentration de TU de 80%, soulignant l'importance des bactéries dans ce processus. Une enzyme d'origine bactérienne, différente de la myrosinase, serait impliquée. En 2014, Kiebooms et al. ont identifié neuf espèces bactériennes, dont *Escherichia coli* et *Enterococcus faecium*, responsables de la formation de TU. Une enzyme membranaire transformerait les glucosinolates en des précurseurs du TU *via* une activité de type myrosinase.

3.3 Différencier le statut endogène / exogène du 2-thiouracile à l'aide de biomarqueurs spécifiques

Malgré plusieurs révisions des seuils, 10 µg/L chez les bovins et 30 µg/L pour les porcs et ovins (Blokland et al. 2021), des animaux peuvent présenter des taux de 2-TU dépassant les seuils de concentrations limites sans avoir d'administration illégale. Les niveaux de 2-thiouracile dans l'organisme sont influencés par plusieurs facteurs et non juste par une voie exogène illicite. Trouver des biomarqueurs discriminant la présence endogène de 2-thiouracile par rapport celle exogène pourrait pallier aux insuffisances de l'approche par le seuil (Wauters et al. 2015).

En utilisant la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (système Q-exactive Orbitrap), Van Meulebroek et al. (2018) ont réussi à trouver des biomarqueurs en comparant les métabolomes de l'urine d'animaux traités et témoins. Le métabolome peut être considéré comme l'ensemble des molécules issu du métabolisme présentes dans un échantillon biologique (Feussner et al. 2023). Cette approche a déjà été efficace pour d'autres

recherches d'anabolisants comme la prednisolone, l'estradiol et la nandrolone. Elle permet d'orienter en dépistage un échantillon vers un groupe considéré comme témoin ou vers un autre considéré comme ayant potentiellement reçu un traitement (Van Meulebroek et al. 2018a; Destrez 2009).

L'étude réalisée avec 8 veaux et 8 vaches a permis d'identifier 11 molécules. Les biomarqueurs trouvés présentent une structure moléculaire proche de celle du 2-thiouracile, participant à confirmer la qualification de métabolite de ces biomarqueurs. Des voies de métabolisation sont suggérées dans la figure 4. Ce sont des processus qui se déroulent probablement dans le tube digestif et le foie des animaux.

De plus, une approche multi-biomarqueurs, en utilisant la présence ou non de plusieurs marqueurs ensemble, permet d'avoir de bons résultats de spécificité et de sensibilité. Pendant le traitement avec des ATS, en utilisant un panel de biomarqueurs, le test a donné, pour les vaches, des valeurs de sensibilité de 100% et de spécificité de 94,9%. Pour les veaux, la sensibilité était plus faible, de l'ordre de 90%.

Ils ont estimé que le TU exogène disparaît de l'urine au bout de 48h pour les veaux et 72h pour les vaches. Pour les veaux, un seul a été retrouvé positif au bout de 24h avec le seuil à 30 µg/L alors que 4 veaux sur 5 sont revenus positifs grâce à la méthode des biomarqueurs. Pour les vaches, la méthode des biomarqueurs a permis d'identifier toutes les vaches traitées au bout de 24h et pour certaines jusqu'à 72h. Cette nouvelle stratégie permet une bonne discrimination des échantillons et offre de bonnes perspectives dans la recherche des résidus d'ATS (Van Meulebroek et al. 2018a).

Dans la recherche de biomarqueurs spécifiques à l'usage illégal de 2-thiouracile, Blokland et al. (2021) se sont intéressés à plusieurs métabolites du 2-thiouracile : le 4-thiouracile, 5-méthyl-2-thiouracile, 6-méthylthiouracile (6-MTU), diméthyl-thiouracile et le S-méthyl-thiouracile. Ce choix a été fait sur l'identification des métabolites les plus abondamment trouvés sur les animaux de l'étude et comparés à des étalons de référence. En s'intéressant à leurs présences au sein de la population et dans des lots de bovins traités, non traités et nourris aux brassicacées (tableau III), ils ont observé que le 6-MTU n'est retrouvé que dans le groupe traité au 2-thiouracile. La présence de cette molécule pourrait donc être liée à l'administration de 2-TU. On peut donc considérer que le 6-MTU pourrait être spécifique du traitement au 2-thiouracile.

Tableau III : concentration moyenne ($\mu\text{g/L}$) et intervalle de confiance à 95% des concentrations de 2-thiouracile et de ses métabolites des bovins de l'expérience et des contrôles nationaux (Blokland et al. 2021).

	Données expérimentales en $\mu\text{g/L}$			Données des programmes de contrôle
	Groupe contrôle	Groupe ration brassicacées	Groupe 2-thiouracile	
2-thiouracile	8.6 \pm 8.0	10.3 \pm 6.8	4504 \pm 774	14.5 \pm 2.6
4-thiouracile	0.9 \pm 0.3	2.8 \pm 1.6	0.9 \pm 0.4	16.5 \pm 5.6
6-methyl-2-thiouracile	0	0	11.2 \pm 3.9	<0.1
5-methyl-2-thiouracile	0	0	0.9 \pm 0.3	0.7 \pm 0.5
S-methyl-thiouracile	0	0	57.7 \pm 45.5	5.7 \pm 1.1

Le 6-MTU a donc été identifié comme marqueur potentiel de l'utilisation frauduleuse du 2-TU chez le bovin et le porc. Il serait intéressant de voir s'il est aussi relevant chez l'espèce ovine.

3.4 Les stratégies décisionnelles

En 2022, l'EURL de Wageningen rédige un rapport rassemblant la recherche des dernières années sur les contrôles des résidus et propose des recommandations pour la commission européenne et les états membres. Il permet de mettre à jour le rapport de 2014.

Les valeurs des seuils préconisées par l'EURL apparaissent dans le tableau IV. Dans le rapport *EURL MMPR guidance paper 2020* un seuil de 10 $\mu\text{g/L}$ pour toutes les espèces dans la thyroïde et l'urine avait été préconisé. Les laboratoires doivent s'assurer que pour les méthodes de dépistage, le $\text{CC}\beta$ est inférieur au MMPR tout comme le $\text{CC}\alpha$ pour les méthodes de confirmation, c'est-à-dire inférieur à 10 $\mu\text{g/L}$.

Tableau IV : présentation des MMPR pour les ATS (EURL MMPR guidance paper 2020)

SUBSTANCES	MATRICE	MMPR*
2-THIOURACILE	Urine	10 $\mu\text{g/L}$ pour toutes les substances
METHYLTHIOURACILE	Thyroïde	
PROPYLTHIOURACILE		
TAPAZOLE		
BENZYLTHIOURACILE		
MERCAPTOBENZIMIDAZOLE		

*minimum method performance requirements

Le rapport de 2022 préconise de changer le seuil de suspicion de 10 $\mu\text{g/L}$ à 30 $\mu\text{g/L}$ pour le porc et de rester à 10 $\mu\text{g/L}$ pour les bovins. Dans les cas où les seuils sont dépassés, ils préconisent de regarder la concentration en 4-thiouracile. Si du 2-thiouracile et du 4-

thiouracile sont trouvés, alors il est probable que cette contamination soit due à une cause naturelle comme une alimentation à base de colza.

De plus, la recherche de 6-methylthiouracile permet de différencier les animaux : si du 6-MTU est présent dans un échantillon alors l'échantillon est non conforme. La figure 11 illustre la stratégie de décision soutenue par l'EURL.

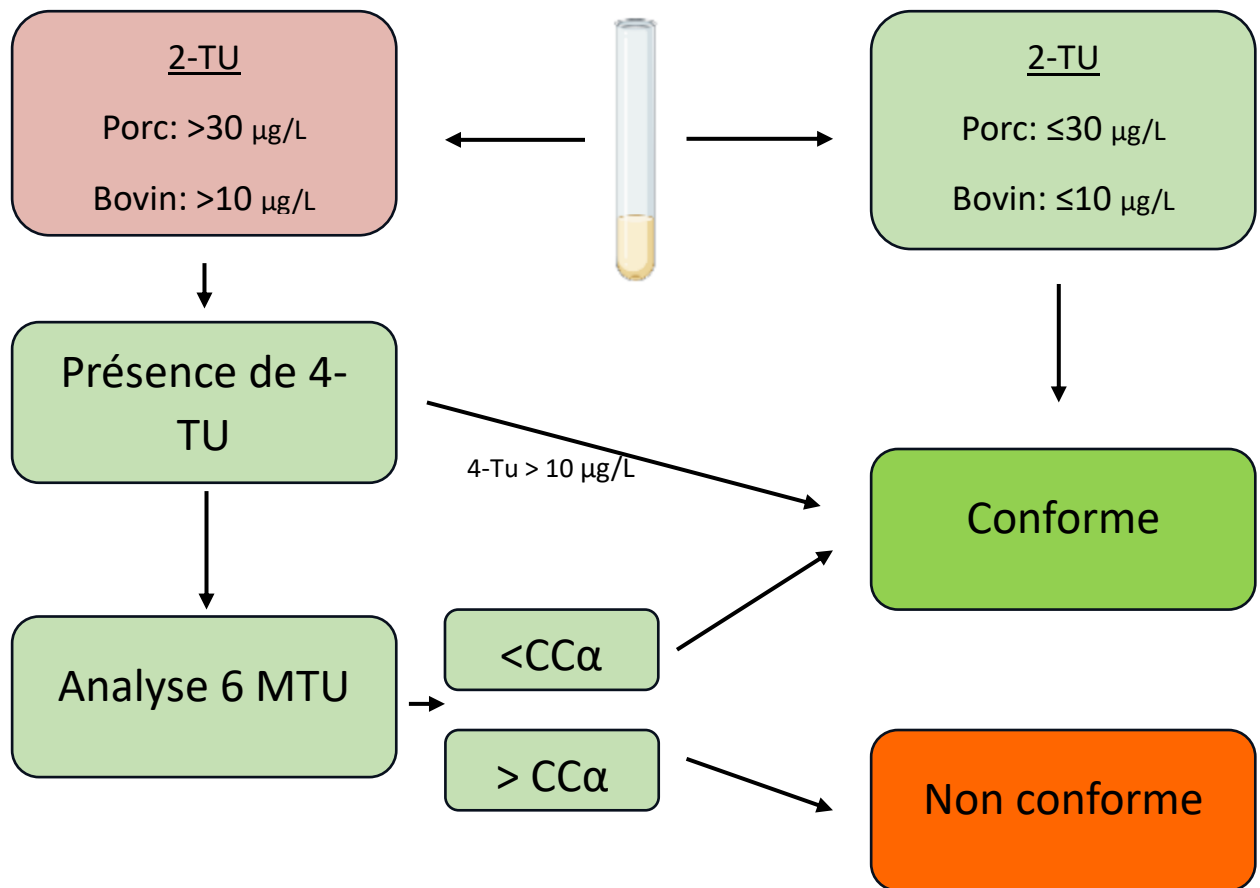


Figure 11: stratégies de décision pour le porc et le bovin (d'après Blokland et al. 2022)

L'EURL spécifie bien que pour les bovins, les porcins, les chèvres et les moutons, la présence de 2-thiouracile peut être due à l'alimentation et pas uniquement à une administration d'ATS (Wageningen Food Safety Research 2022).

4. L'analyse des thyroïdostatiques par LC-MS/MS

4.1. Historique des méthodes d'analyse des thyroïdostatiques

Les méthodes d'analyses ont grandement changé depuis ces dernières décennies, ces techniques ont évolué en suivant la recherche et les innovations technologiques.

La taille et la masse de la thyroïde représentent un critère de dépistage du traitement des animaux par du 2-thiouracile. Les ATS vont induire une diminution du taux d'hormones thyroïdiennes, ce qui va stimuler la sécrétion de TSH, augmentant ainsi l'activité des thyrocytes. Résulte une augmentation de la taille et du poids de la thyroïde, comme l'illustre la photo de la figure 12. (DE BRABANDER 1984) Cette méthode est facilement applicable en abattoir car il suffit de prendre le temps d'observer la taille anormale des thyroïdes. Le poids de la thyroïde de bovins traités au MTU ou avec du méthimazole est souvent multiplié par trois en comparaison à une glande normale. Le critère de sélection des thyroïdes suspectes était une masse supérieure à 60 grammes (Mercier 1983; Vos et al. 1982).

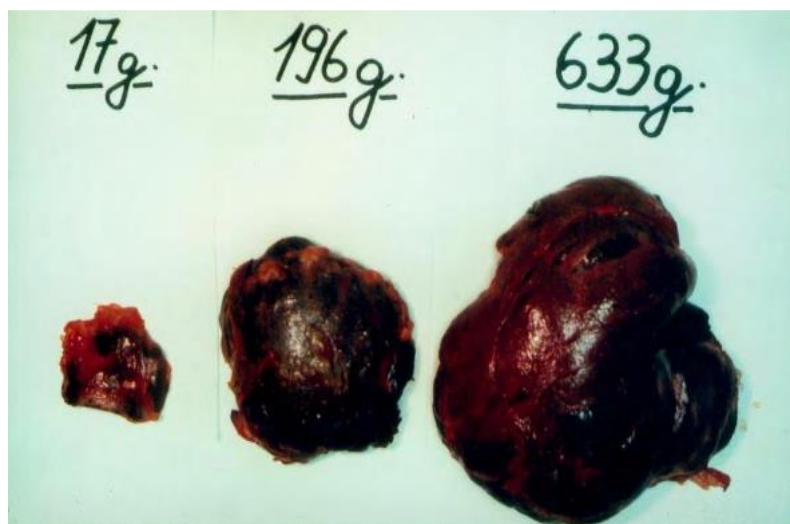


Figure 12: thyroïde de bovin physiologique (17g), thyroïde sous influence de MTU (196g), goitre important (633g) (DE BRABANDER 1984).

Cet examen fut relié à l'histologie, l'utilisation d'ATS va induire des modifications histologiques de la thyroïde, celle-ci peut être identifiée par examen histologique. (Mercier 1983; Dalton, Harold 1948). Dans les années 1970, une méthode de colorimétrie, se basant sur la réaction entre l'ATS et le 2,6 dichloroquinonechloroimide a été utilisée. ; Birkett et al. 1970).

Des techniques chromatographiques ont été inventées dans les années 70 (Buick et al. 1998), mais la technique qui a permis une grande avancée en matière de qualité d'analyse est la spectrométrie de masse couplée à la chromatographie. (Paris et al. 2006, Pinel et al. 2005).

4.2. LC-MS/MS technique privilégiée pour l'analyse des thyrostatiques

Pour détecter les antithyroïdiens dans les différentes matrices animales, les méthodes de séparation chromatographique en phase gazeuse ou liquide (GC, LC) couplées aux techniques de spectrométrie de masse (MS) ont permis une grande avancée et une homogénéisation des techniques de recherche entre les laboratoires (Vanden Bussche et al. 2009; Schilt et al. 1989; DE BRABANDER, Batjoens, Hoof 1991). Elle permet de répondre aux critères de performance de la directive 2002/657/CE. Ces méthodes doivent fournir des indications sur la structure chimique de l'analyte. La décision 2002/657/CE note la justesse minimale à avoir, des caractéristiques de reproductibilité, des critères de performance applicables à la détection par spectrométrie de masse et à la chromatographie.

La sensibilité de la spectrométrie de masse est impactée par la polarité, la taille et la structure du 2-thiouracile. La dérivation avec le 3-IBr (3-iodobenzylbromide) (Figure 13) permet de contrer ces caractéristiques limitantes. Cette étape permet aussi une meilleure stabilité du 2-thiouracile. (Pinel et al. 2005; De Brabander et al. 2007).

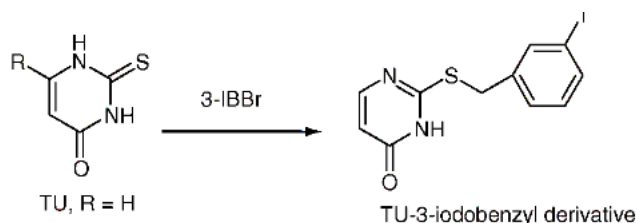


Figure 13 : dérivation du 2-thiouracile avec le 3-IBr

Des études adaptent cette méthode pour différentes matrices. Le tableau V en fait la liste. Ces méthodes permettent d'analyser des concentrations avec un CC α inférieur à 2 $\mu\text{g/L}$, ce qui est satisfaisant pour répondre aux critères de la réglementation.

Tableau V : étude de détection du 2-thiouracile sur différentes matrices par chromatographie et spectrométrie de masse

MATRICE	URINE DE BOVIN	THYROÏDE	LAIT ET FROMAGE	FECES	ALIMENT
ÉTUDE	(Chiesa et al. 2016), (Van Meulebroek et al. 2018b; Tölgyesi et al. 2018)	(Chiesa et al. 2016), (Wauters et al. 2017)	(Bertuzzi et al. 2016) (Woźniak et al. 2021)	(Witek et al. 2018)	(Kiebooms et al. 2015)

La méthode utilisée dans cette étude et utilisée habituellement par le Laberca permet la recherche simultanée, par chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem (triple quadripôle), des principaux thyrostatiques connus. Une détection et une identification à des concentrations inférieures à 1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de ces molécules

est ainsi possible (*Protocole: PROMOTEURS DE CROISSANCE DANS L'URINE DÉTECTION ET IDENTIFICATION DE THYRÉOSTATIQUES PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE COUPLÉE À LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE EN TANDEM, LABERCA/T-u.1.04 2021d*). Les étapes de cette méthode sont décrites dans la partie matérielle et méthode de ce travail.

5. Objectif de la thèse

Ce travail s'inscrit dans la recherche continue du contrôle des résidus d'anabolisants en Europe. Les laboratoires de référence comme le Laberca participent à cette recherche scientifique active. Ces dernières années, l'UPC, l'unité sur les promoteurs de croissance, a déjà réalisé de nombreuses avancées dans le domaine du contrôle des ATS, que ce soit dans le domaine des méthodes d'analyses (Pinel et al. 2010) mais également dans la compréhension de la présence de 2-thiouracile (G. Pinel et al. 2006, Le Bizec et al. 2011). Les avancées scientifiques ont permis de comprendre de mieux en mieux la présence de 2-thiouracile à un niveau faible dans l'urine des principales espèces de production (bovins, porcins) et l'impact des brassicacées sur cette présence. Peu d'études ont fait le parallèle chez les espèces mineures comme les ovins. Ce présent travail aura pour but de vérifier si les schémas décisionnels proposés par l'EURL pour les bovins et le porc sont transposables aux ovins. La recherche d'un ou plusieurs biomarqueurs spécifiques à l'usage de 2-thiouracile est nécessaire pour pouvoir discriminer les animaux traités au 2-thiouracile de ceux contaminés *via* l'alimentation. Ainsi, ce travail permettra de vérifier si le 6-MTU est détectable dans l'urine d'ovins traités au 2-TU et s'il est absent dans l'urine d'ovin non traité au 2-thiouracile. Il sera vérifié que la présence à faible dose de 2-thiouracile et de 4-thiouracile dans l'urine n'est pas synonyme de fraude. L'impact d'une ration enrichie en brassicacée sur la quantité de 2-thiouracile et de ces métabolites sera étudié. De plus, est-ce qu'une administration de 2-thiouracile entraîne une forte excrétion urinaire de 2-thiouracile jusqu'à dépasser les seuils fixés par l'EURL. En outre, l'étude de l'excrétion urinaire du 2-thiouracile et de ces métabolites apportera des informations concernant la pharmacocinétique des ATS et ainsi de disposer d'un meilleur recul sur les analyses et les décisions.

Partie II : Partie expérimentale

1. Présentation et objectif de l'expérience

L'expérience menée a pour but de répondre aux objectifs décrits ci-dessus. L'étude de l'excrétion urinaire des ATS chez la brebis après une administration de 2-thiouracile nous apportera des informations sur la cinétique d'excrétion du 2-thiouracile et de ces métabolites chez cette espèce. L'observation des métabolites rencontrés, en comparant ceux trouvés chez la brebis témoin de ceux retrouvés chez les brebis ayant eu une administration de 2-thiouracile, nous permettra d'identifier, s'il existe, un ou des biomarqueurs discriminant les animaux traités des animaux non traités.

L'excrétion urinaire va être étudiée sur 10 jours chez trois brebis : une brebis témoin, une brebis à laquelle sera administré 0,2 g/100kg de PV de 2-thiouracile pendant trois jours et une troisième brebis avec une concentration plus forte, de 2 g/100 kg de PV. L'analyse par UPLC-MS/MS de l'urine récoltée matin et soir des trois brebis, nous permettra d'observer l'évolution des concentrations urinaires du 2-thiouracile, du 4-TU, du 5-MTU et du 6-MTU au cours du temps, avant, pendant et après l'administration du 2-thiouracile par voie orale. On observera aussi l'impact d'une alimentation enrichie en brassicacées sur l'excrétion du 2-thiouracile et de ces métabolites avec le rajout de colza et de choux dans la ration de la brebis témoin à J-3 du protocole. Par la suite une analyse des résultats des concentrations urinaires de 2-TU, 4-TU, 5-MTU et 6-MTU mesurées dans l'urine de près de 200 moutons nous a permis de voir les concentrations naturelles de ces métabolites observables chez cette espèce. Ces données proviennent des résultats des contrôles annuels exigés par l'UE et d'une étude d'occurrence de ces composés chez les ovins réalisée au LABERCA en 2023.

Ce projet expérimental et de thèse a été réalisé par plusieurs personnes : le personnel du Laberca, le CRIP et moi-même. Pour ma part, j'ai réalisé le prélèvement des échantillons durant les 10 jours, le suivi médical des brebis et leur alimentation. J'ai apporté une aide vis à vis de la réalisation du protocole de l'expérience, son organisation et sur l'analyse et l'interprétation des résultats.

2. Matériels et méthodes

2.1 Expérimentation animale

2.1.1 Présentation des animaux d'expérience

Les animaux de l'expérimentation ont été fournis par le CRIP, Centre de Recherche et d'Investigation Préclinique, structure d'Oniris Vet AgroBio Nantes. Cet organisme nous a fourni les moutons, les bâtiments et une aide technique. Les moutons ont été choisis parmi un troupeau d'une vingtaine d'ovins. Quatre brebis ont été sélectionnées, deux brebis qui auront reçu une administration de 2-thiouracile et une brebis témoin. Une quatrième brebis était

présente pour accompagner la brebis témoin qui, lors de son isolement dû à l'expérimentation, ne pouvait pas rester seule pour des questions de bien-être animal.

Une saisine était nécessaire pour avoir l'autorisation d'effectuer une expérience comportant des animaux. Le protocole de l'expérimentation a été évalué pour juger de la nécessité d'utiliser des animaux pour cette expérimentation et du respect du bien-être animal. La saisine est référencée sous le numéro APAFIS#15159-2018051920446340v2.

Dans une politique actuelle de réduction de l'utilisation des animaux d'expérimentation, les brebis utilisées dans le cadre de ce travail ont pu, après une période définie, participer à une autre expérimentation du CRIP.

2.1.2 Gestion technique des animaux

Les quatre brebis ont été groupées en deux lots de deux. L'organisation et la disposition des brebis a été faite pour minimiser les contacts entre la brebis témoin et les brebis dites contaminées, c'est-à-dire les brebis à qui on aura administré du 2-thiouracile. Les brebis étaient dans deux box paillés (figure 14) avec eau et foin à volonté de 5 m sur 4 m. Une zone de 2 mètres séparait les deux box pour éviter des contacts entre les moutons et des échanges de fluides ou de particules. Un contact visuel avec le reste du troupeau a toujours été possible.



Figure 14 : box paillé des brebis

Les animaux étaient nourris avec du blé en complément du foin. Deux semaines avant le début de l'expérimentation, les brebis ont été isolées du reste du troupeau, un arrêt des concentrés a été effectué. Le but étant de minimiser les sources possibles de brassicacée dans l'alimentation.

Un contrôle journalier des animaux était effectué visant à juger l'état de santé des brebis, le suivi de leur alimentation et les éventuels traitements à leur donner.

2.1.3 Les différentes matrices étudiées et les méthodes de prélèvement

Dans cette expérience, trois matrices ont été prélevées : l'urine, les fèces et la laine. L'urine est la matrice de choix pour la recherche des ATS. (DE BRABANDER 1984). Pour récupérer l'urine, les brebis étaient placées dans des couloirs individuels (figure 15) pour faciliter la contention. Un opérateur se positionne à l'arrière afin de recueillir l'urine dans des pots de prélèvements. Si une miction provoquée par le stress de la manipulation n'avait pas lieu alors une stimulation de la commissure inférieure de la vulve de la brebis permettait, dans la plupart des cas, de provoquer la miction. Dans les cas où une brebis s'abstenait d'uriner, il suffisait d'attendre un moment puis de recommencer la stimulation pour la faire uriner.



Figure 15 : couloir individuel de collecte

Les fèces sont récupérées lors d'une défécation naturelle ou directement par prélèvement dans le rectum.

Un carré de peau sur la cuisse des brebis préalablement tondu avant le début de l'expérience signale la zone à tondre pour le prélèvement. Les tontes suivantes au même endroit permettaient de venir couper court la laine et ainsi de venir récolter l'échantillon de laine nouvellement produite.

Tous les échantillons ont été placés dans des pots de prélèvement en polypropylène, ils ont été identifiés, enregistrés et congelés au sein du Laberca. Les échantillons de fèces et de laine n'ont pas été analysés par la suite et sont stockés au Laberca pour de futurs projets.

2.1.4 Préparation du 2-thiouracile à administrer

Le 2-thiouracile administré est une poudre provenant de Sigma, référencée T7750. Par souci de rigueur, la pureté du produit a été testée a posteriori. Le produit contient du 2-thiouracile pur à plus de 99% mais des traces inférieures à 1% de 6-MTU ont été identifiées. Le produit utilisé n'avait donc pas une pureté de 100% ce qui peut représenter un problème dans notre expérience. Les doses rencontrées dans le produit sont néanmoins minimales. Les concentrations de 6-MTU retrouvées chez les brebis traitées ne peuvent pas être expliquées par la seule présence de l'impureté identifiée dans le produit. Suite au résultat rencontré, une commande du même produit a été entreprise, la pureté de cet autre lot de thiouracile rend compte du même niveau d'impureté. L'impureté n'était donc pas liée au premier lot mais semble inhérente à ce produit.

Le 2-thiouracile pesé et aliquoté en début d'expérimentation était administré le matin après la récolte d'urine. Le 2-thiouracile en poudre était mélangé avec du blé dans une seringue drogueuse et administré directement dans la bouche des brebis. En début d'expérience, les brebis prenaient naturellement le 2-thiouracile dans les gamelles avec le blé mais les fois suivantes, habituées à l'odeur, elles ont refusé de le manger, d'où la nécessité de la seringue drogueuse. Andrews et al. en 1947, ont aussi montré que les moutons n'apprécient guère les aliments contenant du thiouracile.

2.1.5 Protocole d'administration et de collecte des échantillons

Le protocole de l'expérimentation est décrit dans le tableau VI suivant. L'ovine n°1 correspond à la brebis qui a reçu une forte dose de 2-thiouracile, la brebis n°2 correspond à la brebis avec une faible dose de 2-thiouracile. La brebis n°3 est la brebis témoin. La brebis n°3, à partir de J3, une fois l'administration de 2-thiouracile finie pour les deux autres brebis, a eu une ration enrichie en brassicacées. Ce changement de ration a eu pour but d'observer les effets des brassicacées sur l'excrétion de 2-thiouracile et de ces métabolites.

Tableau VI: protocole de l'expérimentation

	J-2 4/12	J-1 5/12	J0 6/12	J1 7/12	J2 8/12	J3 9/12	J4 10/12	J5 11/12	J6 12/12	J7 13/12
Ovin N°1	Ⓢ L	Ⓢ	8h : administration orale de 2g/100kg de TU Ⓢ	8h : administration orale de 2g/100kg de TU Ⓢ	8h : administration orale de 2g/100kg de TU Ⓢ	Ⓢ L	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ L
Ovin N°2	Ⓢ L	Ⓢ	8h : administration orale de 0,2g/100kg de TU Ⓢ	8h : administration orale de 0,2g/100kg de TU Ⓢ	8h : administration orale de 0,2g/100kg de TU Ⓢ	Ⓢ L	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ L
Ovin N°3	Ⓢ L	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ L	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ	Ⓢ L

	Alimentation foin (absence brassicacées)
	Alimentation avec brassicacées (granulé avec colza, choux)
	Ⓢ : Récolte des échantillons, urine, fèces avec en priorité l'urine, matin (8h) et après-midi (17h)
	L : Récolte de laine

A J0, après la collecte de l'urine du matin, le premier traitement a eu lieu, puis à J1 et J2.

2.2 Matériel et réactif

2.2.1 Substance de référence, produits chimiques et réactifs

Les substances de référence sont disponibles chez Sigma Aldrich, elles sont stockées dans du méthanol et conservées au congélateur. Les solutions sont à des concentrations de 0,1 ng/uL ou 0,01 ng/uL.

Les produits et réactifs utilisés pour la recherche des ATS sont listés ci-dessous.

- Hydroxyde de sodium 1M (Fisher Scientific 1052-8240)
- Acide formique (LGC-Standards – SO-9679-B001)
- Acide chlorhydrique 37 % (Grosseron 20252-290)
- Eau ultra pure (produite par le système MILLI-Q du LABERCA)
- Acétonitrile qualité HPLC (Acros 1021-7050)
- Chloroforme (Grosseron 22711.324)
- Dihydrogénophosphate de potassium KH₂PO₄ (Merck - 1048730250)
- Hydrogénophosphate de sodium Na₂HPO₄ (Fluka - 71640)
- Méthanol (Fisher Scientific 1028-4580)
- Solution tampon phosphate de pH 8

Le réactif de la dérivation est le 3-IBBr (3-iodobenzylbromide).

2.2.2 Equipement

En plus du matériel usuel de laboratoire, les agitations se font par centrifugation et vortex. Un bain à ultrasons, une balance de haute précision et un four sont nécessaires pour la dérivation. Des blocs chauffants et des évaporateurs sous flux d'azote permettent l'évaporation du chloroforme utilisé dans les extractions.

L'analyse est réalisée par chromatographie liquide (UPLC ACQUILITY avec pompe binaire, échantillonneur automatique et chambre thermostatée) couplée à un analyseur de masse triple quadripolaire (Xevo, Waters). La colonne de chromatographie est une Acquility UPLC BEH (100 mm x 2,1 mm x 1,7 μ m) et le logiciel d'exploitation pour lire et interpréter les chromatogrammes d'ions est Masslynx.

2.3 Technique analytique et appareils de mesure

2.3.1 Préparation de l'échantillon

Initialement, il est nécessaire d'identifier les échantillons et de s'assurer qu'il y a une quantité suffisante pour effectuer les analyses nécessaires. Les conditions de transport et de stockage doivent garantir l'intégrité des échantillons et ne pas altérer les résultats. Si l'analyse des échantillons est effectuée dans les 48 heures, ils peuvent être conservés au réfrigérateur à une température maximale de +8°C. Dans le cas contraire, ils doivent être placés au congélateur à une température inférieure ou égale à -10°C.

Les échantillons étant stockés dans le congélateur, la première étape de la préparation consistera à la remise à température ambiante. Cinq millilitres sont prélevés dans un tube Falcon avant d'être centrifugés à 2000 g pendant 5 min. Un millilitre d'urine est ensuite mélangé à la solution de tampon phosphate. Suit l'ajout des 2 étalons internes, le DMTU et le MBI-d4.

Un échantillon blanc d'urine est préparé de la même manière. Cet échantillon d'urine ne contient pas d'ATS. Il permet de s'assurer qu'il n'y aura pas de contamination dans l'analyseur. L'échantillon standard lui est préparé avec de l'eau, la solution tampon et les 2 étalons internes. Il permet de vérifier le bon fonctionnement de l'appareil.

Comme il s'agit d'analyse quantitative une gamme extraite est réalisée à partir de plusieurs échantillons d'urine blanche supplémentés à des niveaux différents à partir de solutions individuelles de 2-TU, 4-TU, 5-MTU et 6-MTU et les étalons internes.

Par la suite, l'ajout du 3-IBBR dans les échantillons est réalisé, c'est l'étape de dérivation. Puis une mise à pH acide est réalisée.

2.3.2 Extraction liquide / liquide

Une extraction liquide / liquide est réalisée au chloroforme avec évaporation sous flux d'azote, ce qui permet de ne garder que les résidus sous forme solide. Les étapes de cette extraction sont décrites dans la figure 16 ci-dessous.

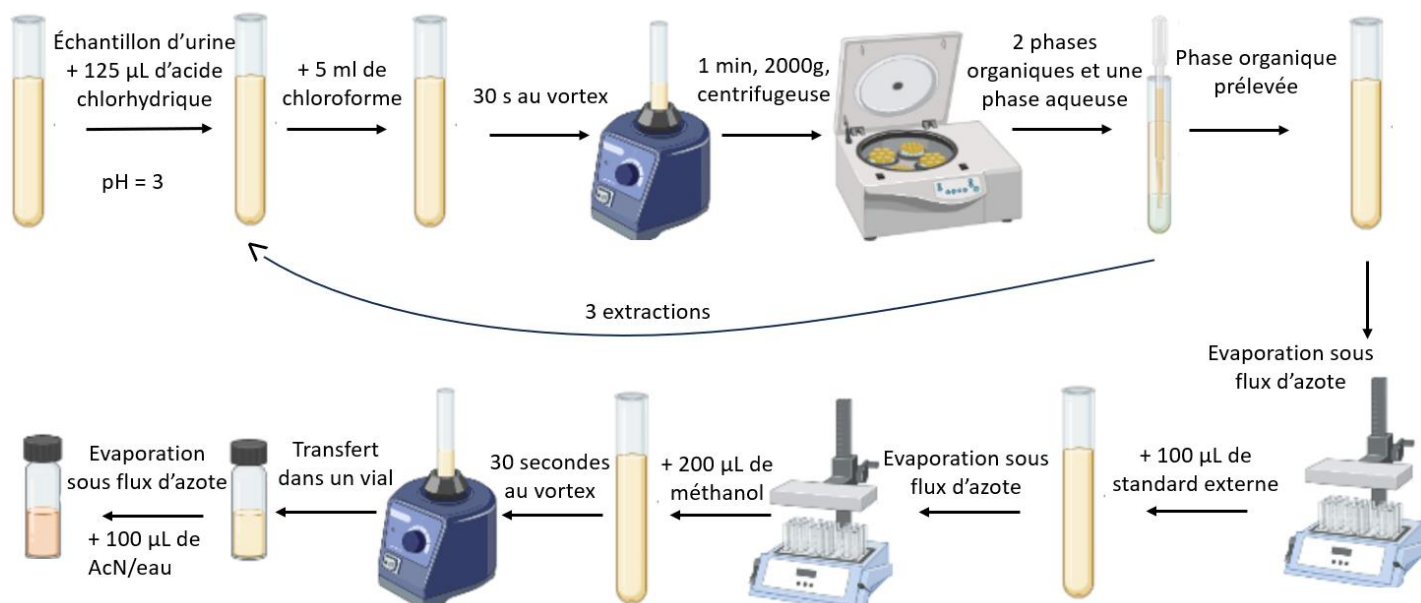


Figure 16 : diagramme illustrant les étapes de l'extraction liquide/liquide

Après la phase d'extraction des composés, les extraits sont analysés par LC-MS/MS.

2.3.3 Séparation chromatographique

La chromatographie liquide est soumise à des conditions particulières, le solvant A composé d'eau et d'acide formique et le solvant B composé d'acétonitrile et d'acide formique vont être soumis à un gradient d'élution lors de la chromatographie. Le débit est de 0,6 mL/min avec une température de colonne à 50°C. Le gradient d'élution des solvants A et B est présenté.

Tableau VII : gradient d'élution

Temps (min)	0	0,45	4,5	9	9,1	10	10,1	12
Solvant A (%)	30	30	40	70	100	100	30	30
Solvant B(%)	70	70	60	30	0	0	70	70

Les échantillons vont être injectés sous un ordre précis pour éviter des erreurs de contamination. Les temps de rétention des analytes sont décrits dans le tableau VIII.

Tableau VIII : temps de rétention indicatif des analytes

Analyte	2TU	4TU	5MTU	6MTU	DMTU	MBI-d4	BPTU
Temps de rétention (min)	3,08	2,7	4,3	4,1	5,4	3,1	4,5

2.3.4 Détection par spectrométrie de masse (mode d'ionisation et de détection)

Les conditions spectrométriques dans lesquelles sont réalisées les analyses sont présentées ci-dessous.

Tableau IX : paramètre associé du spectromètre de masse

Polarité	ES+
Capillaire (kV)	3,5
Température source (°C)	150
Température de désolvatation (°C)	450
Débit du gaz de désolvatation (L/h)	850 to 1000 (conseillé)
Débit gaz rideau (L.h ⁻¹)	150
Pression de nébulisation (bars)	7
Débit du gaz de collision (mL/min)	0,15

Le mode d'enregistrement des signaux est le mode SRM (selected reaction monitoring) et l'analyseur est un triple quadripôle. Par rapport à ce modèle de spectromètre de masse, les énergies de collision des métabolites sont données dans le tableau IX.

Pour chaque analyte, il existe des transitions spécifiques qui permettent leur identification. Le tableau X présente les transitions des principales molécules d'intérêt. Par exemple, pour le 6-méthylthiouracile, la transition 1 est 359,0 > 217,0 avec un potentiel de cône fixé à 35 V, une énergie de collision programmée à 15 eV et pour la transition 2 est 359,0 > 90,0 avec un potentiel de cône fixé à 35 V, une énergie de collision à 40 eV. Une transition complémentaire est disponible pour le 6-méthylthiouracile avec une transition de 359,0 > 299,0 avec un cône à 35 V et une énergie de collision à 20 eV. Le 4-TU et 2-TU possèdent les mêmes transitions mais des temps de rétention différents, il en est de même entre le 5-MTU et le 6-MTU. Les rapports d'intensité entre transitions différentes sensiblement selon les isomères de position.

Tableau X : transitions diagnostiques suivies pour chaque analyte

Molécule	Transition 1	Cône (V)	Energie de collision (eV)	Transition 2	Cône (V)	Energie de collision (eV)	Tr (min)	El associé
2-Thiouracile (2-TU)	345,0 > 217,0	35	20	345,0 > 90,0	35	25	3,08	DMTU
6-Méthylthiouracile (6-MTU)	359,0 > 217,0	35	15	359,0 > 90,0	35	40	4,13	DMTU
DMTU	373,0 > 217,0	35	20	373,0 > 90,0	35	55	5,48	El
Mercaptobenzimidazole-d4 (MBI-d4)	371,0 > 217,0	35	20				3,18	El

Pour obtenir des résultats quantitatifs, il est nécessaire de réaliser des gammes d'étalonnages. Un premier travail avec des échantillons pris dans les différents groupes nous a permis de constituer les bonnes gammes pour chaque brebis avant de commencer l'analyse de tous les échantillons. Pour être optimale, les gammes doivent encadrer les concentrations des échantillons. Des gammes avec des concentrations plus importantes ont donc été utilisées pour les brebis traitées plutôt que pour la brebis témoin. Des dilutions ont été nécessaires pour les échantillons de la brebis traitée avec 2 g/100kg de PV afin d'éviter la saturation des signaux.

2.4 Performances et critères de qualité de la méthode d'analyse

L'interprétation des résultats est cadrée par les critères de qualité définis dans la décision 2002/657/EC. Elle prend en compte la validation des résultats de l'échantillon blanc, du blanc supplémenté, des standards, la présence des étalons internes et externes et les bons signaux ioniques.

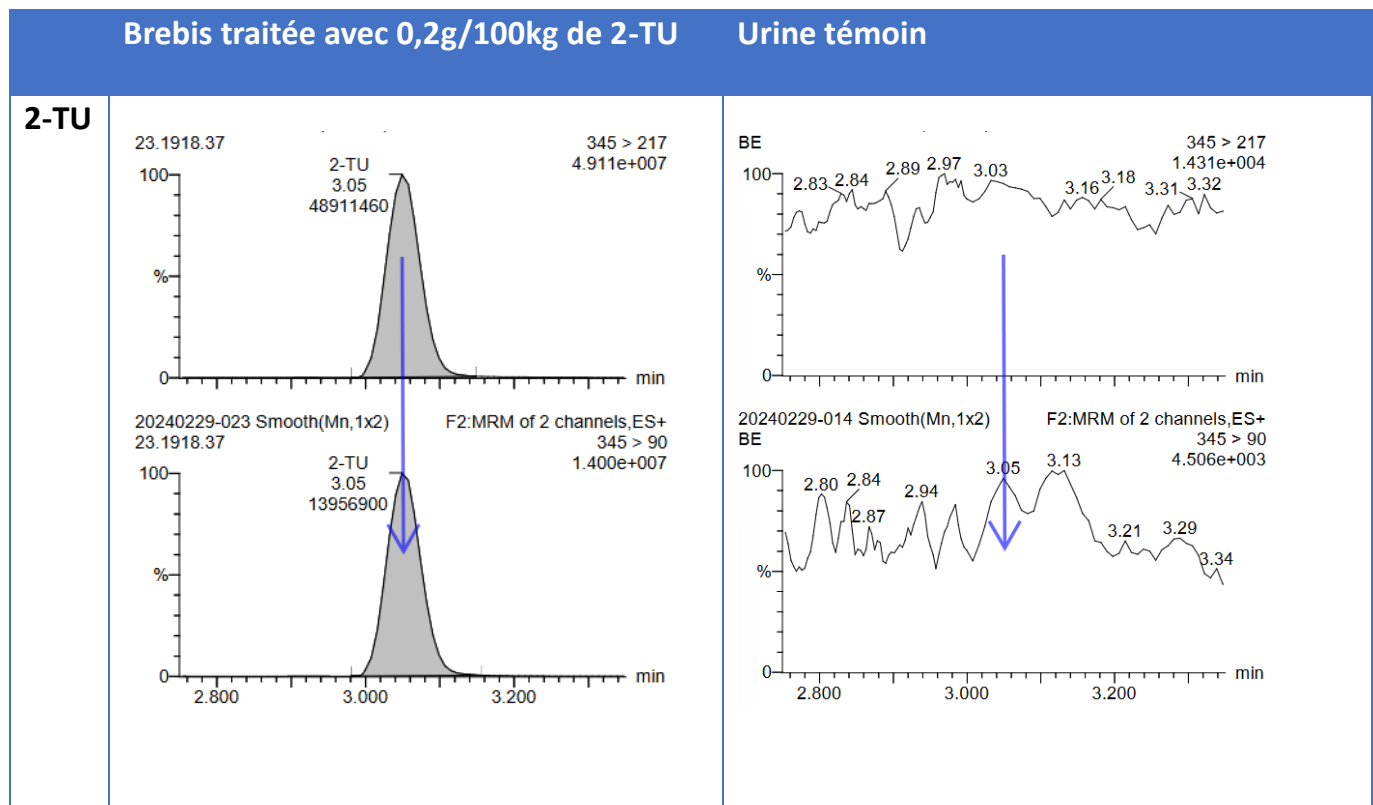
Des procédures de validation de la méthode analytique sont nécessaires. Des critères sont mesurés et contrôlés comme la sélectivité, la spécificité, la linéarité, la justesse, la récupération, l'applicabilité, la robustesse, la stabilité, la répétabilité, la reproductibilité, les limites de décision et de détection ($CC\alpha$, $CC\beta$). La répétabilité est dépendante de conditions où les résultats d'essais indépendants sont obtenus par la même méthode sur des individus d'essai identiques dans le même laboratoire, par le même opérateur, utilisant le même équipement. La reproductibilité est dépendante des conditions où les résultats d'essais sont obtenus par la même méthode sur des individus d'essai identiques dans différents laboratoires, avec différents opérateurs et utilisant des équipements différents. La robustesse est la sensibilité d'une méthode d'analyse aux variations des conditions d'expérience qui peut s'exprimer par une liste des échantillons, des analytes, des conditions d'entreposage, des conditions d'environnement et/ou de préparation de l'échantillon pour lesquels la méthode peut être appliquée telle quelle ou moyennant certaines modifications mineures.

La capacité de détection (CC β) est la plus petite teneur en substance pouvant être détectée et identifiée dans un échantillon avec une probabilité d'erreur β de 5%. La limite de décision (CC α) est la limite à laquelle et au-delà de laquelle il est permis de conclure avec une probabilité d'erreur α qu'un échantillon est non conforme avec α égale à 1%. Cette limite de décision est dépendante de la méthode et de la substance à identifier. Elle est de 1 $\mu\text{g/L}$ pour le 2-TU dans le cadre des PSPC et de 0,23 $\mu\text{g/L}$ pour le 6-MTU (2002/657/CE).

3. Résultats

3.1 Présentation de chromatogrammes

Les résultats sont obtenus en analysant les chromatogrammes après passage dans le spectromètre de masse *via* le logiciel Masslynx. La figure 17 illustre les résultats obtenus pour un échantillon d'urine ne contenant pas d'ATS, le blanc, et pour un échantillon d'urine d'une brebis traitée au 2-thiouracile. On remarquera la présence de 2-TU, 4-TU, 5-MTU et 6-MTU pour cette dernière.



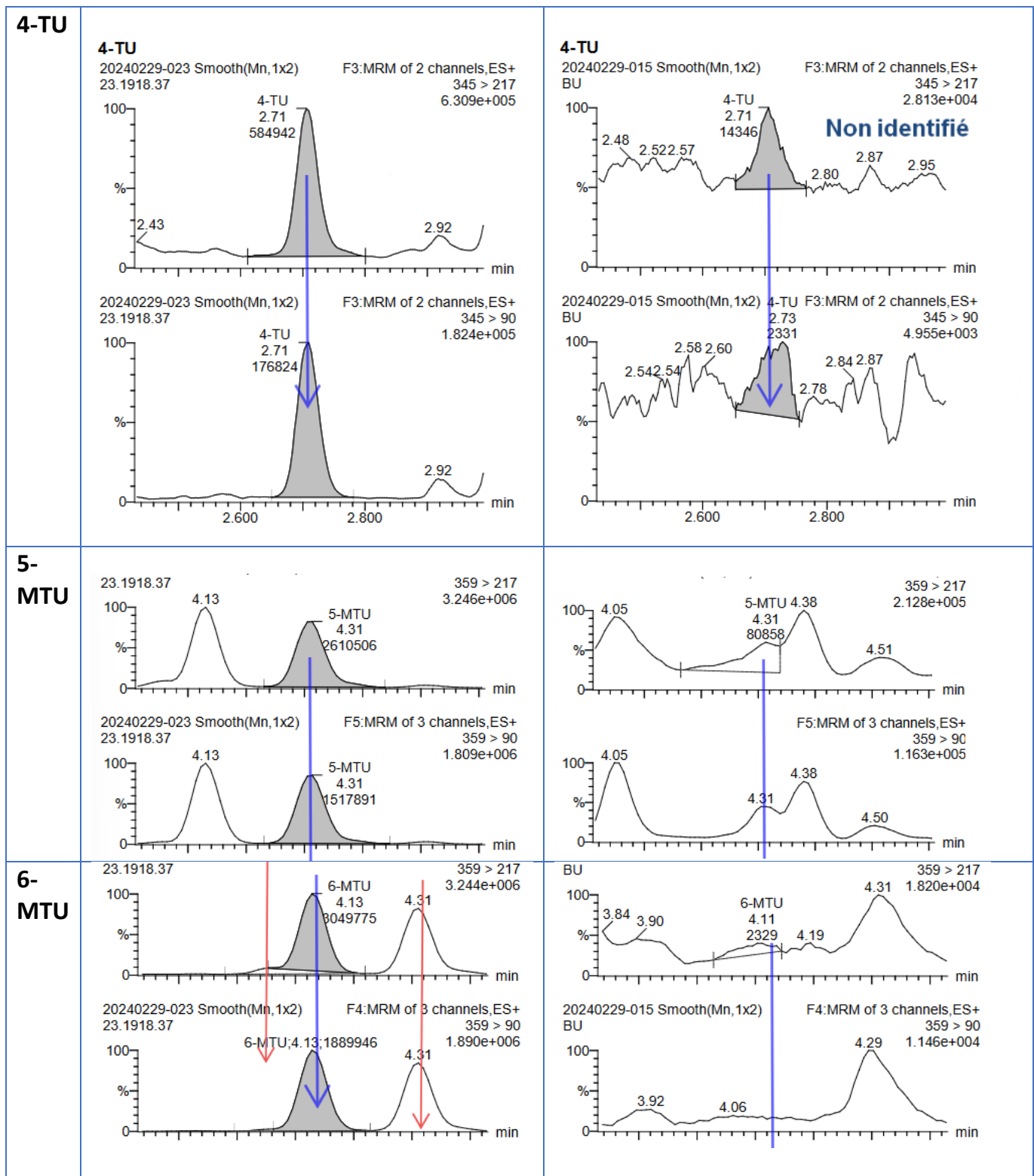


Figure 17 : chromatogrammes d'ion d'un échantillon d'urine témoin et d'un échantillon d'une brebis traitée au 2-thiouracile, les flèches bleues correspondent aux TR attendus des substances recherchées, en rouge des signaux qui ne correspondent pas à la substance recherchée

En comparant les chromatogrammes du blanc avec celui de la brebis traitée, on observe bien que les pics formés à des transitions spécifiques ne se retrouvent pas définis chez l'échantillon blanc.

Pour valider la présence d'une substance, plusieurs critères doivent être respectés :

- présence de deux transitions au TR attendu, le temps de rétention doit être compris dans l'intervalle de confiance par rapport à la référence (2,5% en LC)

- le rapport du signal sur le bruit doit être supérieur à trois pour chaque transition considérée

- la réponse des étalons doit être satisfaisante

- le rapport de l'intensité des transitions est compris dans l'intervalle accordé

Une feuille de critères d'identification est placée en annexe 2. Ce programme permet de confirmer ou non la présence de la substance recherchée en prenant en compte les temps de rétention, les transitions et les rapports des signaux des étalons et le l'analyte. Si la présence de la molécule identifiée est validée alors on peut quantifier sa présence.

Les gammes réalisées nous permettent de quantifier les teneurs en analytes des échantillons. Une feuille de quantification est placée en annexe 3. La droite de régression nous permet de quantifier la concentration en analyte dans l'échantillon.

3.2 Vérification des résultats

Justification d'un point aberrant

Lors du traitement des données, chez la brebis témoin, un résultat ne semble pas cohérent avec le reste des analyses. On note pour le 3^{ème} jour d'administration que l'échantillon d'urine du soir a des valeurs de 2-thiouracile de 3,67 µg/L, de 4-TU de 89,91 µg/L, de 5-MTU de 1,45 µg/L et de 6-MTU de 0,93 µg/L. Alors que pour le reste de l'expérience, les maximums retrouvés sont de 1,30 µg/L pour le 2-TU, de 40,09 µg/L pour le 4-TU, de 0,43 µg/L pour le 5-MTU et le 6-MTU n'a pas été identifié. Se pose la question de la validité de ce résultat. Le risque d'une erreur d'échantillonnage n'est pas nul pendant l'expérimentation. La possibilité d'une erreur d'annotation des échantillons, d'une erreur de lecture et d'enregistrement, reliée à la multitude d'acteurs impliqués dans le processus, a pu rendre possible la lecture d'une urine d'une brebis contaminée à la place de l'urine témoin. Une contamination de cette brebis par les deux autres brebis traitées peut aussi expliquer la présence de 6-MTU dans l'urine et des concentrations augmentées des autres molécules. Etant donné les fortes concentrations excrétées de 2-thiouracile dans l'urine des brebis traitées, on peut envisager que des contaminations se sont faites entre les boxes des brebis malgré la distance entre les boxes et les précautions prises. Du foin, de la paille contaminée par de l'urine peut facilement se déplacer d'un box à l'autre malgré les précautions prises. Cette contamination ne pourrait représenter que de faibles concentrations, ce qui expliquerait que dès l'échantillon d'urine

suivant on retrouve des valeurs normales chez cette brebis. Dans l'étude de Blokland et al. (2021), les auteurs font part aussi de contaminations du groupe contrôle. L'hypothèse émise par les auteurs est la contamination du box du groupe témoin *via* les paniers d'alimentation qui étaient utilisés en commun pour les groupes traités et contrôles.

La présence d'un échantillon avec des valeurs bien différentes des échantillons des autres jours chez la brebis témoin nous amène à étudier la présence de ces quatre métabolites sur une population plus large de moutons. Ce caractère aberrant est renforcé par les résultats d'une étude d'occurrence de ces mêmes molécules menée sur environ 200 prélèvements d'urine d'ovins.

Analyse des concentrations en 2-thiouracile et métabolites d'une population de moutons extérieurs à l'étude

Pour comprendre l'excrétion urinaire des molécules apparentées au 2-thiouracile, il est intéressant de regarder sur une population plus grande de moutons. Une étude a été menée au sein du Laberca dans le cadre d'un stage. Ce travail avait pour but de caractériser la présence de 2-TU, 4-TU, 5-MTU et 6-MTU dans l'urine d'ovin provenant d'éco-pâturage, de pâturage urbain et d'échantillons provenant des PSPC. Le Laberca ayant déjà une banque de données et d'échantillons importante, nous avons pu rajouter d'autres échantillons des PSPC. Au total, les concentrations urinaires de 179 échantillons d'urine de moutons sont présentées dans le tableau suivant.

Tableau XI : concentrations du 2-TU et de ses métabolites dans 179 échantillons d'urine d'ovins

Métabolite	2-TU	4-TU	5-MTU	6-MTU
Moyenne (µg/L)	0,96	12,0	0,33	≤CCα
Médiane (µg/L)	0,19	1,41	0,17	≤CCα
Min (µg/L)	≤CCα	≤CCα	≤CCα	≤CCα
Max (µg/L)	30,65	150,88	2,07	≤CCα
P25 (µg/L)	≤CCα	0,26	≤CCα	≤CCα
P75 (µg/L)	0,82	12,94	0,47	≤CCα
Ecart-type(µg/L)	3,23	24,4	0,4	0

Cette population de moutons montre une hétérogénéité dans les concentrations urinaires de 2-TU et 4-TU mais aucun échantillon ne révèle la présence de 6-MTU.

L'absence de 6-MTU dans une population d'ovins avec des systèmes d'élevages hétérogènes indique que cette substance n'est pas présente à l'état naturel dans l'urine des ovins. De plus, cette substance est aussi absente dans l'urine des autres prélèvements de la brebis témoin et des deux brebis avant l'administration de 2-TU. Ces arguments nous amènent à prendre comme décision de retirer l'échantillon aberrant de la suite de l'analyse des résultats.

3.3 Cinétique d'élimination urinaire du 2-thiouracile et de ses métabolites

Les analyses nous permettent d'obtenir la concentration des molécules recherchées dans l'urine au fil du temps. Nous avons recherché le 2-TU, le 4-TU, le 5-MTU et le 6-MTU.

3.3.1 Comparaison des excrétions du 2-thiouracile et de ces métabolites

Nous pouvons comparer les molécules excrétées et leur cinétique d'élimination au fil du temps entre les différentes brebis. Ainsi, on peut regarder si l'administration à plus ou moins forte concentration de 2-thiouracile entraîne une modification des molécules retrouvées dans l'urine ainsi que la variation des concentrations de ces molécules. Les tableaux XII et XIII donnent un aperçu de ces profils d'élimination urinaire.

Tableau XII : concentrations urinaires maximales du 2-thiouracile et de ses métabolites observés pendant l'expérience (en $\mu\text{g/L}$) * donnée du témoin en enlevant un point aberrant.

	2-TU	4-TU	5-MTU	6-MTU
Brebis témoin*	1,3	40,09	0,76	0
Brebis 0,2 g/100 kg	91,73	4,24	6,64	5,99
Brebis 2 g/100kg	54585,0	3905,0	1880,0	12365,0

Les concentrations retrouvées chez la brebis fortement traitée sont bien supérieures aux concentrations retrouvées chez les autres brebis et ceci pour les quatre métabolites. Regardons la différence de métabolites retrouvés avant et pendant le traitement avec le tableau XIII. Les moyennes des concentrations urinaires des trois jours précédant l'administration et les trois jours avec administration de 2-thiouracile sont données dans le tableau suivant.

Tableau XIII : concentrations urinaires moyennes du 2-thiouracile et de ses métabolites observés pendant les 3 jours d'administration et les 3 jours avant (en $\mu\text{g/L}$), * donnée du témoin en enlevant un point aberrant.

	2-TU		4-TU		5-MTU		6-MTU	
	Pré-traitement	Pendant traitement	Pré-traitement	Pendant traitement	Pré-traitement	Pendant traitement	Pré-traitement	Pendant traitement
Brebis témoin*	0,2	0,5	1,2	9,1	0,04	0,26	0	0
Brebis 0,2g/100 kg	0,3	32,3	1,0	1,9	0	1,8	0	2,1
Brebis 2g/100kg	0,4	30959,2	1,3	1419,2	0	1064,2	0	7000,0

Avant la période d'administration, les concentrations en ATS sont homogènes entre les trois brebis. On observe la présence de 2-TU et de 4-TU à des faibles niveaux, inférieurs à 2 µg/L pour les 3 brebis. On pourrait qualifier ces concentrations de teneur basale en 2 et 4-thiouracil. Malgré le retrait des granulés des brassicacées dans l'alimentation, on retrouve encore la présence de 2-TU et 4-TU. Il serait intéressant de savoir quelles sont les causes de cette présence.

Le 6-MTU est absent de l'urine des brebis hors traitement, tout comme le 5-MTU. Seule la brebis témoin présente de très faibles teneurs de 5-MTU, moins de 0,3 µg/L.

Pendant la phase de traitement, les concentrations urinaires varient énormément comparées à celles des jours avant le traitement, surtout chez la brebis fortement traitée. Le 2-TU est retrouvé chez toutes les brebis mais on le retrouve en très forte concentration chez la brebis ayant eu la forte dose, avec des valeurs dépassant les 54000 µg/L. On note la présence de 5 et 6-MTU chez les brebis traitées alors qu'il n'y en avait pas avant. La brebis fortement traitée possède des concentrations bien supérieures à celle qu'on peut trouver naturellement.

L'administration de 2-TU provoque une hausse des concentrations urinaires en 2-TU et 4-TU mais aussi provoque l'apparition de 5-MTU et 6-MTU chez les brebis traitées. Les concentrations retrouvées chez la brebis fortement dosée sont bien supérieures à celle faiblement dosée. La quantité administrée de 2-thiouracile module logiquement les quantités retrouvées dans l'urine.

3.3.2 Cinétique d'élimination urinaire du 2-thiouracile et de ses métabolites

L'intérêt de regarder la cinétique d'élimination dans le temps du thiouracile et de ses métabolites est de pouvoir comparer les molécules excrétées avant l'administration, pendant et après. Les figures 18 et 19 montrent les excrétions urinaires du thiouracile et de ces métabolites en fonction du temps chez la brebis traitée avec 2 g/100 kg de PV. L'axe des abscisses représente les dix jours d'expérience, deux prélèvements par jour sont faits, un le matin et un en fin d'après-midi. L'axe des ordonnées représente les concentrations urinaires de thiouracile en µg/L.

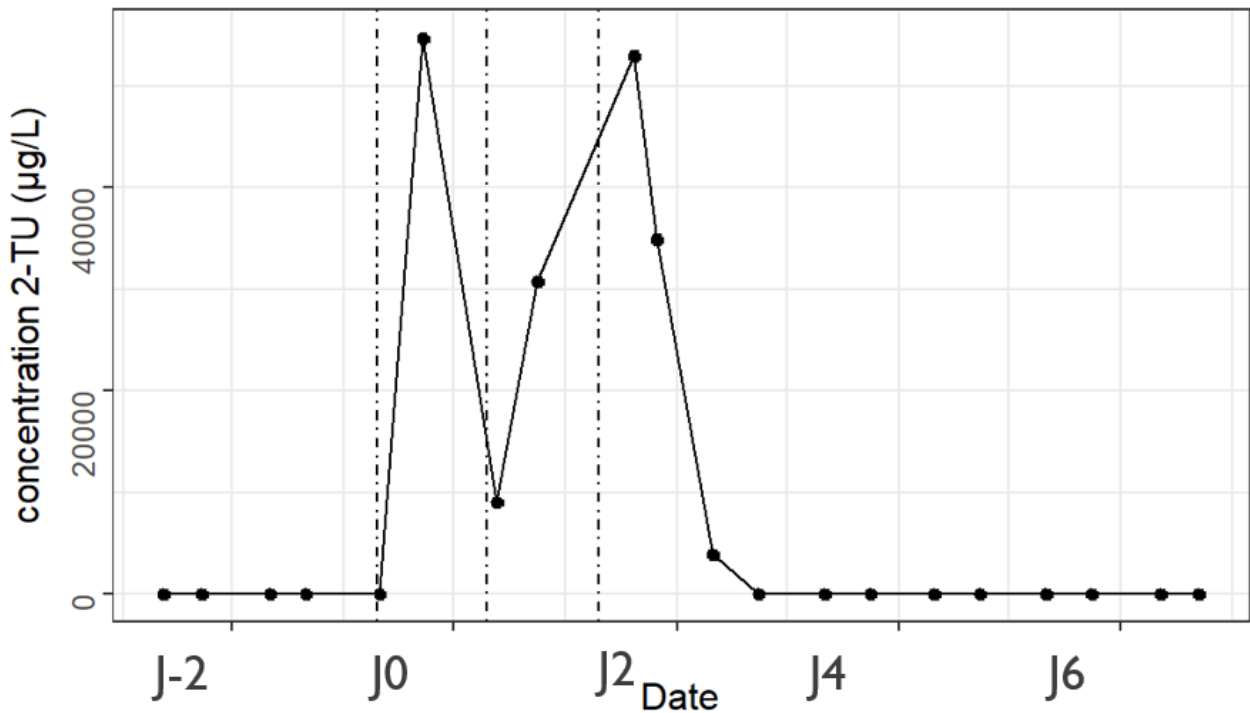


Figure 18 : courbe d'élimination urinaire du 2-TU chez une brebis traitée, courbe en pointillé : administration de 2 g/100kg de PV de 2-thiouracile

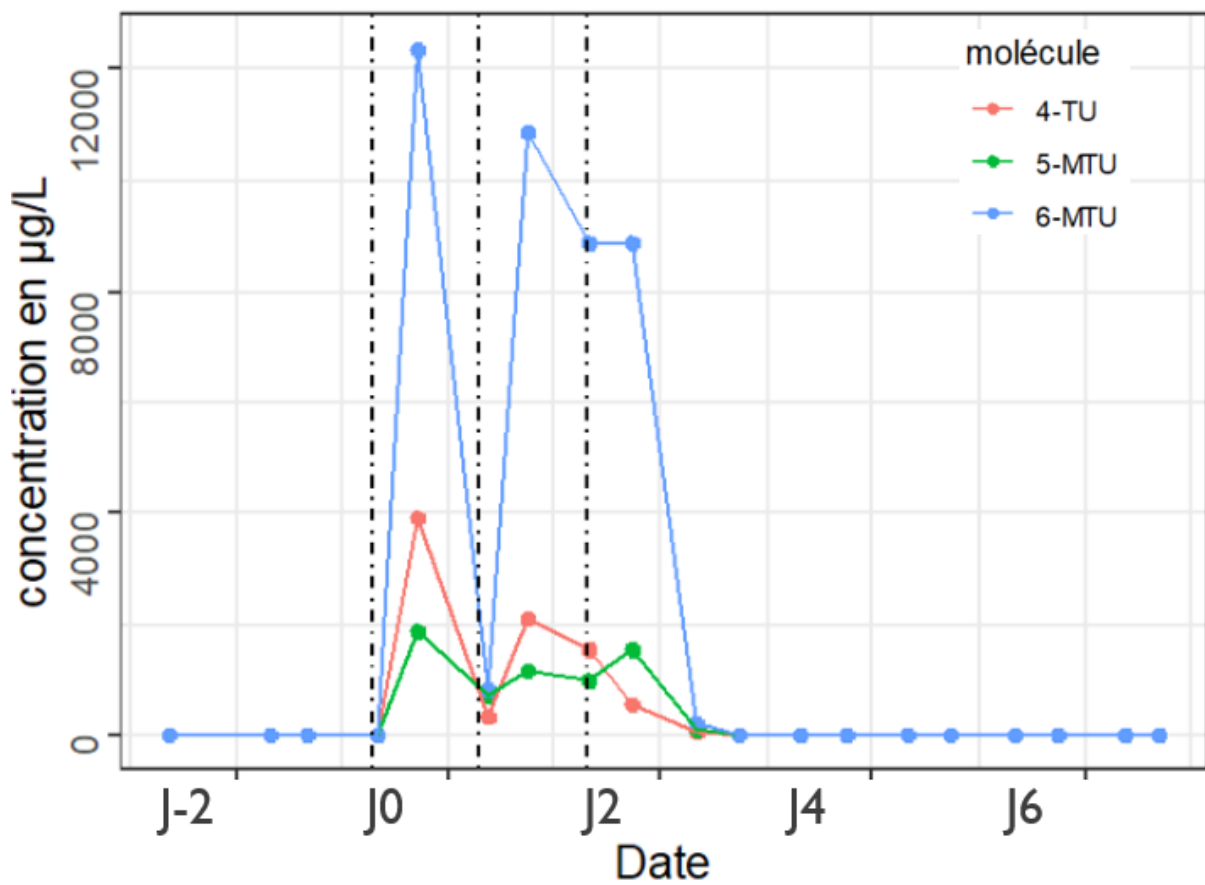


Figure 19 : courbe d'élimination urinaire du 4-TU, 5-MTU et 6-MTU chez une brebis traitée, droite en pointillé : administration de 2 g/100kg de PV de 2-thiouracile

Les deux graphiques représentent l'excrétion urinaire des métabolites d'intérêt au cours des dix jours d'expérience chez la brebis traitée avec 1,2 g de 2-TU pendant 3 jours. Le graphique illustrant l'élimination des analytes de la brebis faiblement traitée est placé en annexe 4. Pour les quatre métabolites recherchés, l'excrétion urinaire est observée dès la première collecte d'urine post administration. Environ 8 heures après la première administration, on retrouve le thiouracile et ses métabolites en fortes concentrations dans l'urine. Les urines analysées lors de la première récolte d'échantillons post administration correspondent aux concentrations les plus hautes retrouvées : 54585 µg/L pour le 2-TU, 3905 µg/L pour le 4-TU, 1880 µg/L pour le 5-MTU et 12365 µg/L pour le 6-MTU. La cinétique d'élimination n'est pas stable dans le temps pendant les 3 jours d'administration. En comparant les concentrations retrouvées le soir avec celle du matin suivant, on remarque qu'elles sont toujours plus fortes en fin de journée qu'en matinée. L'excrétion semble très rapide et les concentrations trouvées diminuent rapidement, assez vite pour avoir une différence entre le matin et le soir. On retrouve les pics de concentration souvent le soir, environ 8h après l'administration.

24 h après la dernière administration, on retrouve encore des concentrations bien supérieures aux taux basaux pour le 4-TU et le 5-MTU, 48 heures après la dernière administration, on retrouve des concentrations de 2-TU supérieures à 10 µg/L.

10h après la dernière administration de 2-TU, la concentration de 6-MTU urinaire est de 8890 µg/L puis tombe à 200 µg/L à 24h, continue de baisser jusqu'à 0,25 µg/L 48h après. Le 6-MTU n'est plus décelable au-delà.

3.4 Cinétique d'élimination urinaire du 2-thiouracile et de ses analogues chez la brebis avec une ration enrichie en brassicacées

Une fois passés les trois jours d'administration, l'excrétion urinaire des composés cibles a été observée après ajout de colza et chou dans la ration de la brebis témoin. A J3, des granulés avec du colza ont été rajoutés et à J4 du chou a été donné dans la ration. La figure 20 retrace l'excrétion des différents métabolites urinaires de cette brebis.

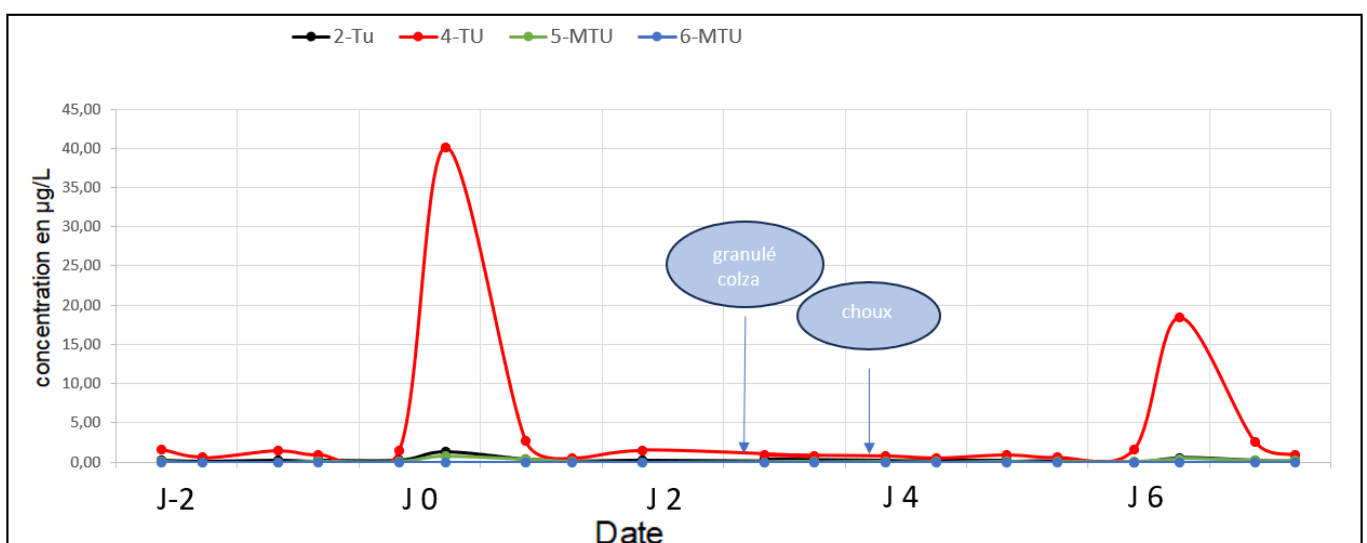


Figure 20 : excrétion urinaire de 2-thiouracile et ses métabolites chez la brebis avec une ration enrichie en brassicacées.

Le graphique précédent représente les concentrations urinaires des quatre métabolites en fonction du temps. Les concentrations en 2-TU et 5-MTU ne dépassent pas 2 µg/L au cours des 10 jours d'expérience. On ne note pas de réelle différence de concentrations retrouvées dans l'urine avant et après l'introduction de brassicacées dans la ration. Les concentrations en 4-TU restent basses et ne dépassent pas 2,7 µg/L sauf en deux points. A J2 et J9, des concentrations de 40 µg/L et 18 µg/L sont présentes. La technique analytique n'a pas détecté de 6-MTU durant l'expérience chez la brebis témoin sauf sur un point, qualifié d'aberrant précédemment. Une période plus longue est peut-être nécessaire pour observer un impact des brassicacées dans l'excrétion urinaire de 2-TU et des autres métabolites. De plus, les quantités données à la brebis ont pu être trop faibles pour qu'on puisse assister à une réelle différence. Les aliments donnés : granulés contenant du colza et les choux pouvaient contenir peu ou pas de précurseurs du thiouracile comme les isothiocyanates.

4. Discussion

4.1 Bilan des résultats

L'administration de 2-thiouracile entraîne une excrétion urinaire rapide de 2-TU, 4-TU, 5-MTU et 6-MTU. Dès 8 heures, après la première administration, on retrouve ces métabolites dans l'urine. Les concentrations retrouvées dépassent largement les seuils définis par l'EURL, de 10 µg/L. Les concentrations retrouvées dépassent les 1000 µg/L pour les quatre substances. Le 6-MTU est apparu dans l'urine des ovins traités et n'est pas présent naturellement chez les ovins de l'expérience. Le 6-MTU semble donc n'être présent que chez les ovins ayant reçu du 2-thiouracile par voie orale.

L'ingestion de brassicacées n'a pas modifié de manière significative l'excrétion de 2-thiouracile et apparentés dans notre expérience et n'a pas entraîné d'excrétion de 6-MTU dans les urines dans les heures et jours suivants.

4.2 Validité des résultats

Lors de cette expérience, les analyses des échantillons ont été effectuées deux fois. Cependant, le délai entre les analyses semble trop important car toutes les concentrations avaient fortement diminué. La période prise entre les deux analyses, plus de deux mois, ne nous a pas permis de pouvoir exploiter les secondes analyses. Les résultats donnés précédemment ne sont donc le fruit que d'une seule analyse. En effet, dû à la faible stabilité des ATS face au temps de stockage et aux cycles de congélation, décongélation, on ne peut pas comparer quantitativement les résultats avec une période trop longue entre les analyses.

Certains résultats ont été obtenus à partir d'échantillons dilués car les concentrations rencontrées étaient trop importantes, comme les résultats du 2-TU pour la brebis traitée avec 1,2 g.

La présence d'un point aberrant pourrait remettre en cause la nature spécifique du 6-MTU. Plusieurs explications peuvent justifier ce résultat aberrant. La solution la plus plausible pour nous est une erreur d'identification ou de contamination lors de la collecte des échantillons. Cette hypothèse est confortée par l'étude d'occurrence du 6-MTU dans une population d'ovins. En effet, sur les 178 échantillons d'urine d'ovin pris dans les PSPC et les études du Laberca, aucun n'a montré la présence de 6-MTU. Les contrôles des PSPC à venir sur la présence de 6-MTU dans les populations d'ovins pourront affirmer ou non cette présence naturelle.

4.3 Impact de l'administration de 2-thiouracile sur l'excrétion urinaire de 2-thiouracile et de ses métabolites

Présence naturelle de 2-thiouracile chez l'ovin

Les premières analyses avant l'administration de 2-thiouracile ont permis d'identifier la présence d'un taux basal de 2-TU, 4-TU et 5-MTU dans l'urine des brebis. Des études avaient déjà caractérisé cette présence de 2-TU dans les populations d'ovins. L'étude de Le Bizec et al. (2011) observe des concentrations urinaires de 2-TU comprises entre $CC\alpha$ et $14,3 \mu\text{g/L}$ et avec une moyenne de $3,3 \mu\text{g/L}$ et une médiane de $2,2 \mu\text{g/L}$ pour une population de 26 ovins. L'étude de Wauters et al. (2015) montre aussi la présence naturelle de 2-TU dans la population d'ovins et dans les autres espèces telles que le bovin et le porc.

Excrétion de 2-TU après son administration par voie orale

Nous avons observé que l'administration de 2-thiouracile entraîne une forte excrétion de 2-TU. En effet, chez la brebis traitée avec 1,2 g de 2-thiouracile, des concentrations urinaires de plus de $54000 \mu\text{g/L}$ sont retrouvées (tableau XII). L'expérimentation de Blokland et al. (2021) rend compte de ce même phénomène chez le porc et le bovin (figure 21). Contrairement à notre étude, le traitement à de faibles doses de 2-thiouracile : $0,2 \text{ g}/100\text{kg}$ de PV, entraîne une forte excrétion de 2-TU chez le porc. Dans notre étude, à cette dose, la brebis n'excrète pas plus de $100 \mu\text{g/L}$ de 2-TU avec une moyenne sur la période d'administration de $30 \mu\text{g/L}$. Dans l'étude de Blokland, l'excrétion est de l'ordre de $10000 \mu\text{g/L}$ chez le porc. La barrière de l'espèce et les conditions expérimentales peuvent expliquer une telle différence. Le porc est un monogastrique alors que le mouton est un ruminant, les deux ont des habitudes alimentaires différentes. Un autre point qui diffère est la présence, lors de la première semaine post-traitement, d'une concentration supérieure à $30 \mu\text{g/L}$ chez le porc alors qu'elle diminue rapidement chez nos ovins de l'expérience. Au bout de 48h, les concentrations de 2-TU chez la brebis traitée à $2 \text{ g}/100\text{kg}$ de PV sont inférieures à $10 \mu\text{g/L}$. L'administration du 2-TU est différente entre les études. L'étude de Blokland mélange le 2-thiouracile dans l'aliment, ce qui crée un niveau constant de 2-TU dans l'organisme au lieu de provoquer de forts pics d'excrétion provoqués par l'administration quotidienne de TU. Dans cette étude, une faible dose de 2-thiouracile n'a pas été étudiée chez les bovins, espèce qui partage le plus de points communs avec les ovins.

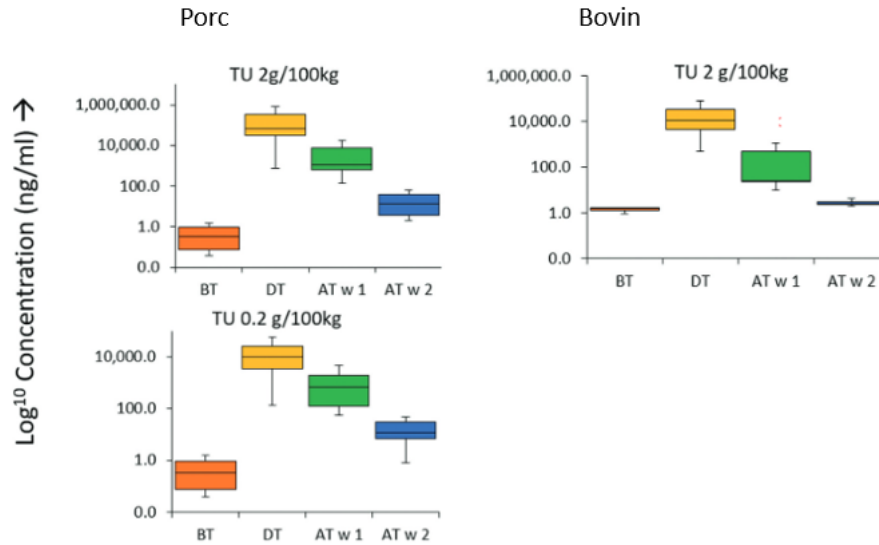


Figure 21 : diagrammes de la concentration logarithmique ($\mu\text{g/L}$) de 2-thiouracile dans les échantillons d'urine. Limite de cases aux 25 et 75 percentiles, trait centrale = médiane, trait du bas et du haut = minimum et maximum, BT = avant traitement, DT = pendant le traitement, ATw1,2 = première, deuxième semaine de traitement (Blokland et al. 2021).

Pour les deux brebis traitées, on a des concentrations pendant l'administration qui dépassent les seuils conseillés par l'EURL de $10 \mu\text{g/L}$. Cela prouve que l'utilisation des seuils est utile, pendant une période de traitement les concentrations urinaires en 2-TU sont largement supérieures aux seuils mis en place. Cependant, l'excrétion urinaire de 2-thiouracile diminue rapidement et se rapproche des valeurs basales de 2-thiouracile. L'utilisation de biomarqueurs a donc son importance pour différencier de manière stricte les animaux traités aux 2-thiouracile des animaux non traités.

Excrétion de 4-TU, 5-MTU et 6-MTU après l'administration de 2-TU par voie orale

Peu d'études reflètent l'impact de l'administration orale de 2-TU sur les concentrations urinaires de 4-TU, 5-MTU et 6-MTU chez l'ovin et chez les autres espèces de production. L'administration de 2-thiouracile chez les deux brebis traitées entraîne une excrétion urinaire de 2-TU, de 4-TU, de 5-MTU et de 6-MTU. Cette excrétion est relativement forte (tableau XIII), les concentrations dépassent largement les seuils pour tous les métabolites. L'administration de 2-TU n'est visible pas que par l'excrétion urinaire de 2-TU mais on peut aussi l'observer par une augmentation de l'excrétion urinaire de 4-TU, 5-MTU et 6-MTU. Le rapport de l'EURL en 2022 propose comme recommandations que si du 2-TU et du 4-TU sont rencontrés dans un échantillon alors l'origine de cette présence est sûrement due à une implication de l'alimentation et non à un apport exogène. Cependant, dans notre expérimentation, la forte excrétion de 2-TU et 4-TU est due à l'administration de 2-TU et ne s'explique pas que par l'alimentation. La présence de 6-MTU permet cette distinction, autre recommandation de l'EURL.

4.4 Usage du 6-méthylthiouracile comme biomarqueur discriminant de l'usage illégal du 2-thiouracile chez les ovins

L'expérience réalisée montre bien le lien entre l'administration de 2-TU et l'excrétion urinaire de 6-MTU. L'administration de 2-TU provoque, en moins de 8h, l'apparition de ce métabolite dans les urines et on le retrouve jusqu'à 48h après la dernière administration. Reste à s'assurer que le 6-MTU ne peut pas être produit naturellement comme peut l'être le 2-TU, le 4-TU ou le 5-MTU. En effet, en s'intéressant à des échantillons d'urine de moutons des PSPC, d'éco-pâturages et de pâturage urbain, une étude du Laberca (Anaïs Dubourg; 2023) a pu mettre en valeur l'occurrence naturelle de 2-TU, 4-TU et 5-MTU chez les ovins. Sur tous les échantillons d'urine, les analyses n'ont pas permis d'isoler de 6-MTU. La variété d'élevages sélectionnée permet de soutenir l'argument selon lequel le 6-MTU ne peut pas être retrouvé chez les ovins naturellement. Les résultats des PSPC provenant de nombreux élevages ne montrent pas non plus de présence de 6-MTU (tableau 9). Les deux brebis de l'expérience ne présentaient pas de 6-MTU avant l'administration de 2-TU. Ces nombreux résultats concordants nous poussent à voir le 6-MTU comme un biomarqueur de l'administration orale de 2-TU.

L'étude de Blokland et al, en 2021, nous conforte dans cette démarche. En travaillant avec des bovins et des porcs, ils ont montré que le 6-MTU n'était pas présent naturellement et qu'il était spécifique de l'administration de 2-thiouracile. Les ovins semblent donc suivre la même tendance que les bovins et les porcs. Les auteurs soulignent aussi qu'il est, logiquement, un indicateur de l'administration de méthylthiouracile (MTU), autre ATS utilisé comme anabolisant.

La démarche conseillée par l'EURL et le rapport de 2022 semble être transposable aux ovins d'après nos résultats. En effet, le 6-MTU semble être un bon marqueur spécifique du traitement au 2-thiouracile chez les ovins.

Pour conforter ces résultats, une étude comportant plus d'animaux pourrait être envisagée. En effet, notre étude ne comportant que trois moutons, les lots n'étaient composés que d'un seul individu. Le but principal de l'expérience étant d'observer l'excrétion urinaire de 6-MTU après une administration de 2-TU, nous pouvions le voir que sur un seul individu. Cet effectif restreint ne nous permet pas de faire des traitements statistiques pour confirmer nos hypothèses. Un minimum de cinq ovins dans chaque groupe nous aurait permis de s'assurer statistiquement de la validité de nos résultats.

De plus, la période de traitement utilisée dans notre expérience semble courte par rapport à celle utilisée dans les élevages dans un contexte de fraude. L'administration de 2-thiouracile a été effectuée sur trois jours alors que d'autres études montraient une période d'administration qui allait de 3 à 4 semaines. Cette plus longue période d'administration peut entraîner une modification de la cinétique d'élimination des ATS.

Cependant, une utilisation de plus d'animaux et sur une durée plus longue entraîne des coûts d'expérimentation plus importants. L'avantage de notre expérimentation est sa facilité, sa rapidité d'organisation.

Discordance entre la formation de 6-MTU à partir de 2-TU exogène et l'absence de 6-MTU à partir du 2-TU endogène

Les ovins présentent des concentrations naturelles de 2-TU, 4-TU, 5-MTU. Les concentrations maximums retrouvées naturellement sont de l'ordre de 30 µg/L pour le 2-TU et 140 µg/L pour le 4-TU (tableau XI). On a pu voir qu'en administrant du 2-TU par voie orale, du 4-TU, du 5-MTU et du 6-MTU sont fortement excrétés, des voies métaboliques existent donc entre ces molécules apparentées. On peut donc se demander pourquoi on ne retrouve pas de 6-MTU chez les animaux présentant du 2-TU endogène. Lorsqu'on administre du 2-TU par voie orale, on retrouve du 6-MTU dans l'urine. Pourtant, le 2-TU endogène, retrouvé parfois à des concentrations de plus de 30 µg/L (tableau X) ne semble pas former de 6-MTU. On peut se demander s'il y a une différence de voie métabolique entre ces sources de 2-thiouracile qui empêche la formation de 6-MTU dans le cas du 2-thiouracile endogène. Les concentrations formées de 6-MTU sont peut-être également trop faibles pour être détectables par les techniques analytiques. Dans le cas d'une brebis contrôlée lors du PSPC, présentant une concentration de 30 µg/L de 2-TU, c'est presque la même concentration que la brebis traitée avec 0,2 g/100kg de PV de 2-TU. Or, chez cette première brebis, on ne retrouve pas de 6-MTU alors qu'on retrouve du 6-MTU chez la brebis traitée. On peut donc se demander par quel mécanisme le 2-TU par voie orale est transformé en 6-MTU alors que le 2-TU qu'on retrouve chez des animaux non traités n'implique pas de retrouver du 6-MTU dans l'urine.

Les recherches de Kiebooms (2014) peuvent apporter une piste de réflexion. Le 2-TU produit après ingestion de brassicacée est principalement présent dans le gros intestin. Les nombreuses bactéries et leurs métabolismes permettent probablement cette présence endogène. On peut se poser la question si la différence de lieu d'absorption du 2-TU peut entraîner des différences dans ses biotransformations. Le 2-TU ingéré par voie orale doit être surtout absorbé *via* les intestins grêles. Peut-être que la distribution du 2-TU exogène et du 2-TU endogène n'est pas la même, ce qui pourrait expliquer les différences de métabolisation et donc pourquoi du 6-MTU n'est pas présent avec la présence de 2-TU endogène.

Une autre piste de réflexion peut être apportée par l'origine du 2-TU naturel. Le 2-TU d'origine naturelle provient probablement de précurseur tel que les glucosinolates présents dans les brassicacées. La présence de certains métabolites pourrait dépendre du précurseur initial. La figure 22 présente la formation possible de 5-MTU à partir de glucosinolate. La conformation initiale des glucosinolates rend chimiquement possible cette synthèse. Pour la synthèse de 6-MTU, on pourrait s'intéresser à un isomère de position du dérivé méthyle du glucosinolate, cet isomère pourrait expliquer chimiquement la formation de 6-MTU à partir des glucosynolates. Si cet isomère de position des glucosinolates est absent *in vivo* chez les ovins alors on pourrait expliquer pourquoi on ne retrouve pas de 6-MTU dans les urines. La figure 22 décrit les étapes biochimiques qui pourraient expliquer la formation de 5-MTU et 6-MTU à partir de glucosinolates. L'absence de la molécule B, isomère de position du dérivé méthyle de la molécule A pourrait expliquer l'absence de 6-MTU dans l'urine d'ovin non traité.

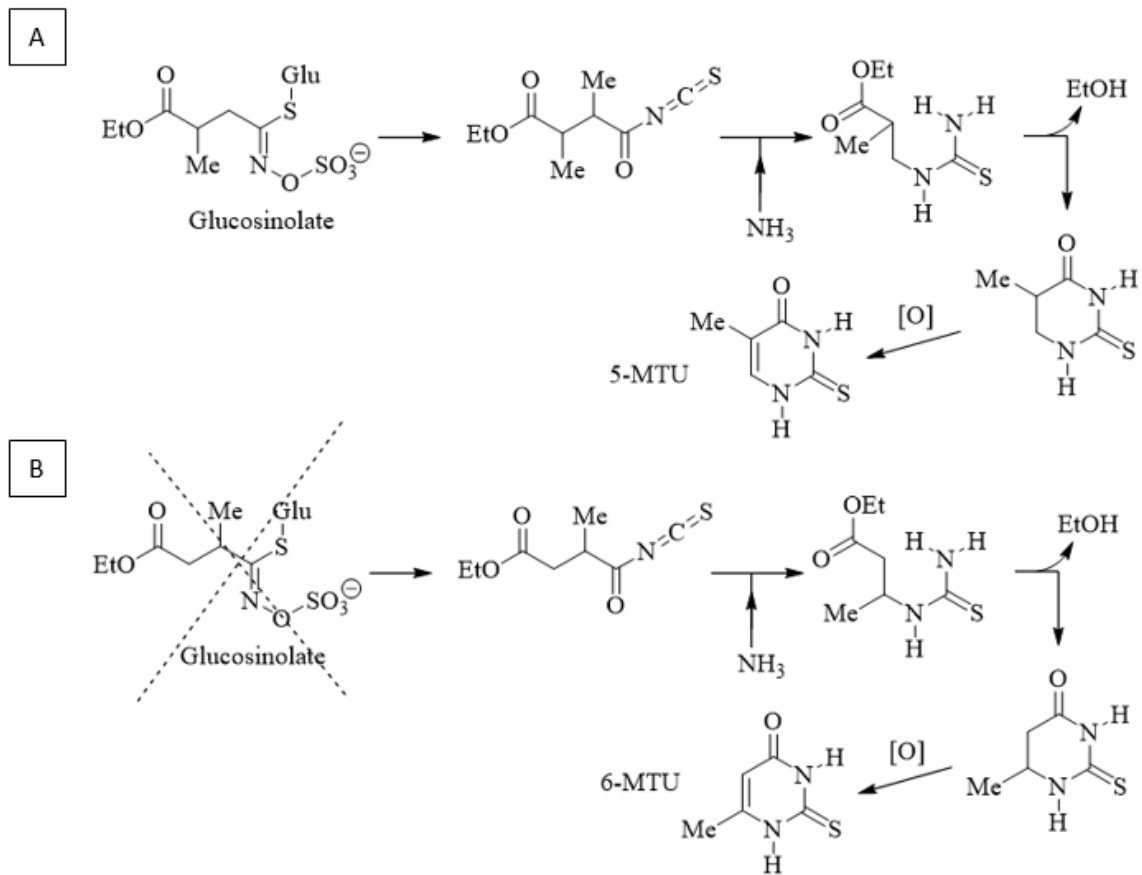


Figure 22 : formation de 5-MTU et 6-MTU à partir de glucosinolates (à partir de Kaplaneris et al. 2015 et J.Lebreton)

Discordance dans les concentrations urinaires observées entre la brebis recevant une faible dose et la brebis recevant une forte dose de thiouracile

La concentration urinaire de 2-TU observée chez la brebis recevant 2 g/100 kg de PV de 2-TU par voie orale est en moyenne, sur les trois jours d'administration, de l'ordre de 30000 µg/L. Pour la brebis recevant 0,2 g/100 kg de PV, les concentrations observées sur ces trois jours d'administration sont de l'ordre de 30 µg/L. Un facteur 1000 est ainsi observé entre les concentrations urinaires de 2-TU des deux brebis alors que la dose administrée par voie orale n'est que 10 fois moins forte. Un rapport de 600 est observé en comparant les maximums d'excrétions urinaires de 2-TU entre les deux brebis. La différence entre la concentration de 2-TU urinaire des deux brebis est importante alors que la dose administrée n'est que 10 fois moins forte. On peut se demander pourquoi on ne retrouve pas plus de 2-TU dans l'urine de la brebis faiblement traitée. On n'aurait pu s'attendre à retrouver un facteur 10 dans les concentrations urinaires observées entre les deux brebis. Une hypothèse formulable est qu'une certaine quantité de 2-TU est stockée dans l'organisme ou métabolisée sous d'autres formes. Le 2-TU peut être en partie lié à des protéines ce qui expliquerait qu'on ne retrouve pas la totalité du 2-TU administré dans l'urine.

Compréhension de la formation du 6-MTU à partir de 2-TU

Van Meulebroek (2018) et Blokland (2021), à travers leurs études, montrent la présence de 6-méthylthiouracile dans l'urine après l'administration de 2-TU chez les bovins et les porcins. Le 2-TU a une structure proche du 6-MTU (figure 1). Un lien logique est fait entre l'administration orale de 2-TU et l'apparition de 6-MTU dans l'urine des ovins. Il serait intéressant de comprendre par quels mécanismes biologiques ce phénomène existe.

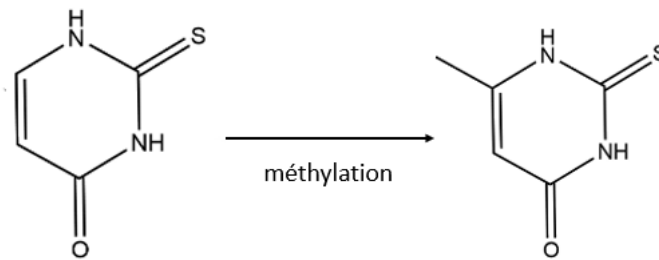


Figure 23 : méthylation du 2-TU en 6-MTU

Comme de nombreuses substances xénobiotiques, après absorption, le 2-TU subit des biotransformations et des métabolites sont formés. Ces biotransformations nécessitent des enzymes. Par exemple, la méthyltransférase est une enzyme qui permet de transférer d'une molécule à une autre des groupements méthyles (Francioso et al. 2020). L'hypothèse de l'action de méthyltransférases est envisageable, cette voie chimique est possible, mais dans des conditions particulières, présence de bases fortes puis agents de méthylation. Ces biotransformations sont présentes dans la plupart des tissus mais le rein et le foie semblent être des organes plus actifs que les autres dans ces méthylations (Lindsay et al. 1974 ; Abou-Donia 2015). Après le passage de la barrière intestinale, le 2-TU, *via* la circulation sanguine, passe par le foie dans lequel potentiellement la réaction de méthylation se fait. Il est ensuite excrété par l'urine en passant par le rein. Le processus de méthylation (figure 23) pourrait être mis en parallèle avec un processus de détoxification de ce xénobiotique par l'organisme. (Sarcione, Sokal 1958) Ce processus pourrait augmenter l'excrétion du TU absorbé. D'autres études pourraient être réalisées pour mieux comprendre ce phénomène. Il serait intéressant d'étudier le ou les lieux de la réaction de méthylation et s'il y a un certain pourcentage de 2-TU qui est métabolisé en 6-MTU.

Cette méthylation pourrait être comparée à une autre réaction de méthylation, celle responsable d'une étape de la transformation de l'uracile en thymine (figure 24).

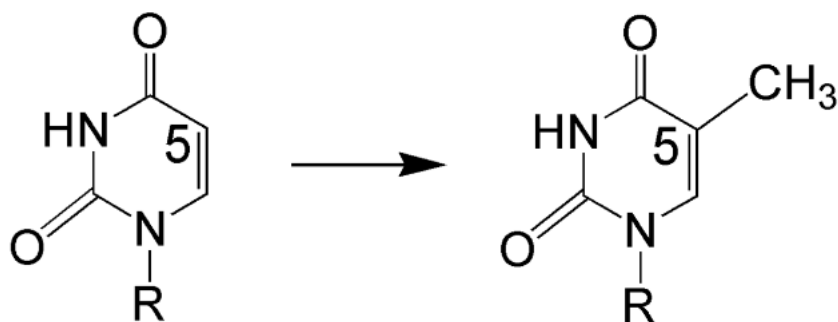


Figure 24 : réaction de méthylation de l'uracile catalysée par une enzyme (Mishanina, Koehn, Kohen 2012).

L'étude de Mishanina, Koehn, Kohen, en 2012, s'intéresse aux mécanismes et aux structures des enzymes responsables de la méthylation biologique de l'uracile. La thymidylate synthase (TSase) et la flavin-dépendant thymidylate synthase (FDTs) sont des méthyltransférases utilisant des cofacteurs comme le $\text{CH}_2\text{H}_4\text{folate}$ comme source de méthyle. D'autres enzymes sont responsables de cette méthylation comme la S-adenosylmethionine (SAM)-dépendant RNA méthyltransférases. Cette méthylation de l'uracile intervient dans la biosynthèse de l'ADN et modification post-traductionnelle de l'ARN. L'uracile présente une structure proche de celle du thiouracile mais ces deux molécules ne sont pas identiques. On peut penser que de telles enzymes peuvent intervenir *in vivo* mais il faut garder un certain recul sur la transposition des enzymes responsables de la méthylation car ces enzymes peuvent être très spécifiques de leurs réactifs et il en existe une grande diversité.

Recherche de méthode pour augmenter le délai entre dernière administration et détection de la fraude

Deux jours après la dernière administration de 2-TU, du 6-MTU était encore détectable chez les deux brebis traitées. L'excrétion du 6-MTU est rapide et après deux jours, on n'observe plus de 6-MTU. L'étude de Van Meulebroek et al. (2018b) a pu montrer des résultats similaires. En effet, l'utilisation d'un panel de biomarqueurs a permis de détecter des bovins traités 48h après la dernière administration et jusqu'à 72h, pour certains individus. L'arrêt des traitements des ATS à des fins de fraude précède souvent l'abattoir (Tangl, Kunffy, Farkas 1967). On peut donc penser que les dernières administrations d'ATS sont souvent proches du moment de l'abattoir et donc de l'analyse, si le prélèvement se fait à l'abattoir. Cependant, il est facile d'imaginer que plus de 48h se passent entre la sortie de l'élevage et l'arrivée à l'abattoir des animaux. Il serait pertinent d'avoir une méthode qui permette de détecter la fraude avec un délai plus long entre la dernière administration et l'analyse.

Le 2-TU, le 6-MTU et les ATS en général se concentrent dans la thyroïde : 48 h après une injection de 5 mg de 2-thiouracile chez un rat (International Agency for Research on Cancer 2001), le rapport de concentration en 2-thiouracile entre la thyroïde et le sang est de 156. Le MTU est 20 à 200 fois plus concentré dans la thyroïde que dans les muscles (DE BRABANDER 1984). Cette bioaccumulation thyroïdienne pourrait être intéressante dans la recherche de

biomarqueurs car on peut penser que les biomarqueurs seront détectables plus longtemps. En effet, dans notre étude, le 6-MTU disparaît aux alentours de 48h, une méthode qui permettrait d'augmenter ces délais serait pertinente dans la lutte de l'utilisation de TU. Surtout que la thyroïde n'est pas un organe d'excrétion ou de forte métabolisation comme le foie, son pouvoir de stockage dans le temps est peut-être plus important. Une étude pharmacocinétique montrant la concentration de 6-MTU dans la thyroïde en fonction du temps après une administration de 2-TU serait pertinente. Cela nous permettrait de voir si le 6-MTU est surtout un métabolite urinaire du 2-TU ou si sa distribution est étendue à d'autres organes.

D'autres matrices peuvent être d'intérêt comme les poils, les phanères, les fèces, la salive... Même si l'urine est connue pour être la matrice de choix pour détecter le 2-thiouracile (*RIKILT Wageningen 2014*), l'excrétion est forte mais elle diminue rapidement. Trouver une matrice dans laquelle le 6-MTU serait stocké plus longtemps permettrait d'augmenter le délai entre dernière administration et analyse pertinente. Par exemple, vu les fortes valeurs de 6-MTU excrétées, 7000 µg/L (tableau X), si une partie part dans les onglons ou la laine, on peut faire l'hypothèse que ce métabolite soit détectable bien des jours après.

Des études seraient donc pertinentes vis-à-vis de la nature de la matrice à détecter pour répondre à la rapidité d'excrétion du 6-MTU.

Recherche d'autres biomarqueurs

Une autre perspective pour augmenter le délai entre la dernière administration et l'analyse de l'échantillon, pour s'assurer de la réelle utilisation d'ATS, serait de trouver d'autres marqueurs de l'usage illégal de 2-TU. L'étude de Van Meulebroek et al. (2018) a identifié d'autres biomarqueurs que le 6-MTU. La figure 4 présente ces métabolites.

Des biomarqueurs ne présentant pas de ressemblance structurelle avec le 2-thiouracile existent, comme le montrent les molécules B de la figure 4. Une diversité de biomarqueurs existe donc et d'autres biomarqueurs spécifiques à l'usage de 2-thiouracile chez les ovins peuvent être recherchés.

La recherche d'autres matrices peut se faire en même temps que la recherche d'autres biomarqueurs. Peut-être que certains duos matrice-biomarqueurs sont plus pertinents que le duo urine/6-MTU pour détecter l'usage de 2-thiouracile.

Une étude reprenant différentes matrices d'intérêt comme la thyroïde et en comparant les métabolomes d'animaux traités et d'animaux témoins pourrait nous permettre d'identifier d'autres biomarqueurs. Ces biomarqueurs pourraient illustrer la fraude sur une phase de « washout » plus longue, c'est-à-dire le temps depuis la dernière administration de 2-TU.

Conservation de l'analyse

Le 2-thiouracile et ses apparentés sont des molécules instables dans le temps (Vanden Bussche et al. 2009). Un stockage trop long entre la récolte de l'échantillon et l'analyse pourrait diminuer les concentrations retrouvées dans l'échantillon et donc interférer l'analyse. La conservation de l'échantillon va donc aussi jouer un rôle important dans ce contrôle.

Par souci de vérification, nous avons refait les analyses des échantillons des trois brebis pendant la période de traitement pour vérifier qu'on obtenait les mêmes résultats. Les tendances se sont vérifiées mais toutes les concentrations ont diminué. Les métabolites recherchés se sont donc rapidement dégradés en l'espace de deux mois, temps entre les deux analyses. La congélation et la décongélation des échantillons ont pu accélérer ce phénomène.

Etant donné les faibles concentrations retrouvées après un ou deux jours suivant la dernière administration, il faut être sûr que la conservation des ATS contenus dans l'urine soit correctement faite. A ces concentrations, on peut vite descendre en dessous des seuils de détection de la méthode d'analyse et donc rater l'excrétion de 6-MTU, indicateur de la fraude. L'EURL conseille de descendre le pH à 1 et d'ajouter une solution d'EDTA. Il faut aussi éviter les cycles de congélation et de décongélation (Wageningen Food Safety Research 2022). L'EURL pousse à trouver d'autres protocoles pour augmenter la conservation de ces molécules très instables. Ces protocoles de conservation pourraient être mis en place au plus tôt après la prise de l'échantillon dans la ferme ou l'abattoir.

D'autres études pour améliorer la conservation des ATS et surtout du 6-MTU seraient pertinentes pour améliorer la qualité de l'analyse.

4.5. Discussion de l'effet d'une ration enrichie en brassicacée sur l'excrétion urinaire de 2-thiouracile et apparenté

Les résultats de notre étude montrent la présence de 2-TU, 4-TU et 5-MTU sur les premiers jours de l'expérience, période où aucun ATS n'était administré. La consommation de brassicacée peut entraîner une excrétion de 2-TU urinaire chez le bovin (G. Pinel et al. 2006). On peut se demander pourquoi, chez ces brebis, dans nos conditions d'expérience, de telles concentrations sont retrouvées. Les brebis n'avaient accès qu'à du foin, du blé et de l'eau. Le but était d'éviter toute contamination par des brassicacées. On peut expliquer cette présence urinaire de 2-thiouracile par une consommation de brassicacée malgré nos efforts d'éviction. Le foin peut contenir des plantes de cette famille. La période d'éviction des autres aliments, d'une semaine avant l'expérience, n'est potentiellement pas assez longue pour permettre à l'organisme de ne plus avoir d'effet de la ration antérieure. D'autres facteurs pourraient être responsables de cette excrétion naturelle de 2-thiouracile.

Reste à vérifier si la consommation de colza et de choux pendant le dernier tiers de l'expérience a modifié l'excrétion de 2-thiouracile et de ces métabolites. L'analyse des données du témoin ne semble pas montrer un réel impact de la ration enrichie en brassicacée sur l'excrétion des métabolites. L'étude de G. Pinel et al. (2006) a montré le lien entre l'ingestion de brassicacée et l'excrétion urinaire de TU. Dans notre expérience, nous n'avons pas réussi à

montrer un tel impact. Une étude avec des conditions expérimentales plus contrôlées serait pertinente : aliment avec des ingrédients connus et contrôlés, plus d'animaux pour pouvoir interpréter statiquement les résultats, un environnement plus confiné qui empêche les contaminations, une période avec une ration supplémentée en brassicacée plus longue et avec des proportions plus fortes de brassicacée. Dans l'étude de Kiebooms (2014), un mélange de colza entier, moulu, en farine, de brocoli et de chou-fleur composant 30% de la ration a été utilisé.

4.6 Perspectives

L'utilisation des métabolites dans les PSPC est déjà en cours. D'après Blokland et al. 2021, aucun cas de 6-méthylthiouracile n'a été signalé au cours des dix dernières années. Globalement, l'usage du 2-thiouracile et des ATS n'est pas d'actualité dans l'engraissement des animaux de production. La surveillance active de la part de l'Europe renforce cette non-utilisation. Le 6-MTU, en plus d'être utilisé pour détecter les fraudes d'utilisation du 2-thiouracile chez les bovins et les porcins, peut permettre de détecter les fraudes chez les ovins. Actuellement, le 2-TU est dosé lors des campagnes de détection, on peut se demander si le 6-MTU urinaire ne suffirait pas aux méthodes de détection. Il permettrait de détecter l'usage de 2-thiouracile et de 6-MTU en même temps. Pour ce qui est des analyses d'urine, la détection du 6-MTU résoudrait la problématique de savoir si l'origine du 2-thiouracile est endogène ou non. Seuls les animaux présentant du 6-MTU ressortiraient des campagnes de détection et des enquêtes pourraient alors être lancées. La recherche d'un seul métabolite au lieu de trois pourrait faire gagner en efficacité le laboratoire et diminuer les coûts d'analyse.

Conclusion générale

L'amélioration des performances zootechniques des animaux de production, rendue possible notamment par l'usage de promoteurs de croissance, peut accroître la rentabilité des élevages. Toutefois, l'emploi de certaines substances soulève des préoccupations d'éthique et d'innocuité pour le consommateur. Les antithyroïdiens de synthèse (ATS) ou thyrostatiques sont strictement interdits en élevage au sein de l'Union Européenne. Pour s'assurer de l'absence de leur utilisation dans les filières de production animale, des contrôles sont pratiqués par les Etats *via* des plans de surveillance et de contrôle. Le contrôle de l'usage du 2-thiouracile, principal ATS, s'appuie sur la recherche de ses résidus dans les urines. La possibilité que l'animal excrète cette substance sans avoir été traité complique sa mise en évidence. Des seuils ont été établis pour juger de la conformité d'un échantillon biologique, respectivement 10 µg/L et 30 µg/L dans les urines de bovins et de porcins. La présence naturelle de 2-thiouracile dans l'urine des animaux de ces espèces constitue une réelle problématique pour le contrôle et la prise de décision. Cette excrétion naturelle de 2-TU est en partie expliquée par des régimes alimentaires riches en brassicacées. Des études récentes, menées notamment par le LABERCA, ont permis d'identifier des biomarqueurs potentiels, dont le 6-MTU, pour discriminer les deux situations chez les bovins et les porcins. La pertinence du test basé sur le 6-MTU, et sa robustesse, n'ont jamais été investiguées chez les ovins alors que les animaux de cette espèce excrètent spontanément eux aussi du 2-TU lorsque leur alimentation est riche en brassicacées. L'objectif de notre travail a donc été d'évaluer le caractère diagnostique du 6-MTU pour signer une administration frauduleuse de 2-thiouracile. Nous avons caractérisé les concentrations urinaires du 2-TU et de trois de ses métabolites, le 4-TU, le 5-MTU et le 6-MTU par couplage LC MS/MS. Des cinétiques d'élimination ont été construites sur 10 jours chez trois brebis après administration *per os* de différentes doses de 2-TU pendant trois jours. Nous avons mis en évidence l'excrétion urinaire de 6-MTU chez les brebis traitées par le 2-TU jusqu'à 48h post-administration. Nous avons aussi démontré l'absence de ce métabolite dans les urines d'animaux non traités provenant de plans de surveillance français (n=200) et/ou dont le régime alimentaire était fortement enrichi de brassicacées. La démonstration du caractère diagnostique du 6-MTU comme marqueur d'une fraude au 2-TU chez l'ovin aura une application directe à court terme dans les réseaux de laboratoire en charge du contrôle en France et en Europe.

BIBLIOGRAPHIE :

- ABOU-DONIA, Mohamed B., 2015. Metabolic Biotransformation of Xenobiotics. In : MOHAMED B., Abou-Donia (éd.), *Mammalian Toxicology* [en ligne]. 1. Wiley. pp. 101-129. ISBN 978-1-119-94041-8. Disponible à l'adresse : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118683484.ch6>
- ACEVEDO, Ramon, SCHWEIGERT, B. S., PEARSON, P. B. et DAHLBERG, F. I., 1948. Effect of Feeding Thiouracil to Swine on the Rate of Gain and Weight of the Thyroid Gland. *Journal of Animal Science*. 1 mai 1948. Vol. 7, n° 2, pp. 214-221. DOI 10.2527/jas1948.72214x.
- ANAÏS, DUBOURG, 2023. Rapport de stage Caractérisation de la présence endogène du thiouracile chez les ovins et conséquences sur les contrôles officiels. . 2023.
- ANDREWS, F. N., BEESON, W. M., BARRICK, E. R. et HARPER, Claude, 1947. The Influence of Thiouracil and Thiourea on the Growth and Fattening of Lambs. *Journal of Animal Science*. 1 février 1947. Vol. 6, n° 1, pp. 3-11. DOI 10.2527/jas1947.0613.
- BEESON, W. M., ANDREWS, F. N. et BROWN, P. T., 1947. The Effect of Thiouracil on the Growth and Fattening of Yearling Steers. *Journal of Animal Science*. 1 février 1947. Vol. 6, n° 1, pp. 16-23. DOI 10.2527/jas1947.6116.
- BERTUZZI, Terenzio, RASTELLI, Silvia, MULAZZI, Annalisa et PIETRI, Amedeo, 2016. Trace Monitoring of Goitrin and Thiouracil in Milk and Cheese. *Food Analytical Methods*. 1 octobre 2016. Vol. 9, n° 10, pp. 2952-2959. DOI 10.1007/s12161-016-0483-9.
- BIRKETT, D.J., PRICE, N.C., RADDA, G.K. et SALMON, A.G., 1970. The reactivity of SH groups with a fluorogenic reagent. *FEBS Letters*. 25 février 1970. Vol. 6, n° 4, pp. 346-348. DOI 10.1016/0014-5793(70)80095-3.
- BLAKELY, R.M. et ANDERSON, R.W., 1949. The Influence of Thiouracil on Growth, Fattening, Feed Consumption and Thyroid Weight of Turkey Broilers. *Poultry Science*. mars 1949. Vol. 28, n° 2, pp. 185-188. DOI 10.3382/ps.0280185.
- BLOKLAND, Marco H., VAN TRICHT, Frederike E., GROOT, Maria J., VAN GINKEL, Leendert A. et STERK, Saskia S., 2021. Discrimination between the exogenous and endogenous origin of thiouracil in farm animals, the final chapter? *Food Additives & Contaminants: Part A*. 2 décembre 2021. Vol. 38, n° 12, pp. 2077-2090. DOI 10.1080/19440049.2021.1967463.
- BLOKLAND, Marco, VAN TRICHT, Frederike, TISSEN, Marian et STERK, Saskia, 2022. Proposal for strategy with regard to Thiouracil. . 2022.
- BOISON, Joe, 2012. Analysis of Antithyroid Drug Residues in Food Animals. *Bioanalysis*. août 2012. Vol. 4, n° 16, pp. 2067-2083. DOI 10.4155/bio.12.166.
- BORON, Walter F. et BOULPAEP, Emile L., 2012. *Medical Physiology, 2e Updated Edition*. Elsevier Health Sciences. ISBN 978-1-4557-1181-9.
- BRABANDER et VERBEKE, R., 1982. DETERMINATION OF OXAZOLIDINE-2-THIONES IN BIOLOGICAL FLUIDS IN THE ppbf RANGE. . 1982. *Journal of Chromatography*, 252 (1982) 225-239
- BUICK, Robert K., BARRY, Caroline, TRAYNOR, Imelda M., MCCAUGHEY, W. John et ELLIOTT, Christopher T., 1998. Determination of thyreostat residues from bovine matrices using high-

performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. décembre 1998. Vol. 720, n° 1-2, pp. 71-79. DOI 10.1016/S0378-4347(98)00453-8.

BUSSCHE, Julie Vanden, KIEBOOMS, Julie A. L., DE CLERCQ, Nathalie, DECEUNINCK, Yoann, LE BIZEC, Bruno, DE BRABANDER, Hubert F. et VANHAECKE, Lynn, 2011. Feed or Food Responsible for the Presence of Low-Level Thiouracil in Urine of Livestock and Humans? *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 25 mai 2011. Vol. 59, n° 10, pp. 5786-5792. DOI 10.1021/jf200556x.

CESBRON, Nora, 2017. *Les SARMS (Selective Androgen Receptor Modulators) : une nouvelle famille d'agents anabolisants. Etude des effets zootechniques associés et développement de stratégies analytiques visant la mise en évidence de leur utilisation chez le jeune bovin*. Nantes, Oniris.

CHIESA, Luca Maria, LABELLA, Giuseppe Federico, PASQUALE, Elisa, PANSERI, Sara, PAVLOVIC, Radmila et ARIOLI, Francesco, 2016. Determination of Thyreostats in Bovine Urine and Thyroid Glands by HPLC–MS/MS. *Chromatographia*. mai 2016. Vol. 79, n° 9-10, pp. 591-599. DOI 10.1007/s10337-016-3068-2.

COMSA, Eugénie, ROCHE-FONDEUR, S., MAZZOCUT, D., MICHAUX, Jean-Michel et MOUTHON, Gilbert, 1982. Méthodes d'identification et de dosage de substances thyrostatiques dans les aliments pour bovins. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*. 1982. Vol. 135, n° 3, pp. 411-421. DOI 10.4267/2042/65234.

COURTHEYN, D, LE BIZEC, B, BRAMBILLA, G, DE BRABANDER, H. F, COBBAERT, E, VAN DE WIELE, M, VERCAMMEN, J et DE WASCH, K, 2002. Recent developments in the use and abuse of growth promoters. *Analytica Chimica Acta*. 25 novembre 2002. Vol. 473, n° 1, pp. 71-82. DOI 10.1016/S0003-2670(02)00753-5.

DALTON et HAROLD, 1948. *morphologic changes in the organs of female mice after long-term ingestion of thiourea and thiouracil*. U.S. Department of Health, Education, and Welfare, Public Health Service, National Institutes of Health.

DAVIDSON, B., SOODAK, M., NEARY, J. T., STROUT, H. V., KIEFFER, J. D., MOVER, H. et MALOOF, F., 1978. The irreversible inactivation of thyroid peroxidase by methylmercaptoimidazole, thiouracil, and propylthiouracil in vitro and its relationship to in vivo findings. *Endocrinology*. septembre 1978. Vol. 103, n° 3, pp. 871-882. DOI 10.1210/endo-103-3-871.

DE BRABANDER, BATJOENS et HOOFF, 1991. determination of tyreostatic drugs by hptlc with confirmation by GC-MS. . 1991.

DE BRABANDER, H., 1984. *PITFALLS, METHODS and CRITERIA in the ANALYSIS of RESIDUES and CONTAMINANTS in BIOLOGICAL MATERIAL*. UNIVERSITEIT GENT.

DE BRABANDER, H. F., LE BIZEC, B., PINEL, G., ANTIGNAC, J.-P., VERHEYDEN, K., MORTIER, V., COURTHEYN, D. et NOPPE, H., 2007. Past, present and future of mass spectrometry in the analysis of residues of banned substances in meat-producing animals. *Journal of Mass Spectrometry*. août 2007. Vol. 42, n° 8, pp. 983-998. DOI 10.1002/jms.1272.

DESTREZ, Blandine, 2009. *Approches analytiques ciblées et non ciblées visant la démonstration de pratiques nouvelles d'usage de promoteurs de croissance en production animale*. Thèse de doctorat Chimie analytique, Université de Nantes.

EURL MMPR guidance paper, 2020. [en ligne]. Disponible à l'adresse : https://eurl-residues.eu/wp-content/uploads/2020/12/EURL_MMPR_guidance-paper_final.pdf

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, SALVATORE, Stefania et FERRER, Marta Vericat, 2024. Report for 2022 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products. *EFSA Supporting Publications* [en ligne]. mars 2024. Vol. 21, n° 3. [Consulté le 15 mai 2024]. DOI 10.2903/sp.efsa.2024.EN-8669. Disponible à l'adresse : <https://data.europa.eu/doi/10.2903/sp.efsa.2024.EN-8669>

FERRANDO, R., 1973. l'utilisation des anabolisants dans la production de viande. . 1973.

FEUSSNER, Kirstin, ABREU, Ilka N., KLEIN, Moritz et FEUSSNER, Ivo, 2023. Chapter Twelve - Metabolite fingerprinting: A powerful metabolomics approach for marker identification and functional gene annotation. In : JEZ, Joseph (éd.), *Methods in Enzymology*. Academic Press. pp. 325-350. *Biochemical Pathways and Environmental Responses in Plants: Part B*.

FRANCE, Chambres d'agriculture, 2024. Le marché des oléagineux. [en ligne]. 22 avril 2024. Disponible à l'adresse : <https://chambres-agriculture.fr/actualites/toutes-les-actualites/detail-de-lactualite/actualites/le-marche-des-oleagineux/>

FRANCIOSO, Antonio, BASEGGIO CONRADO, Alessia, MOSCA, Luciana et FONTANA, Mario, 2020. Chemistry and Biochemistry of Sulfur Natural Compounds: Key Intermediates of Metabolism and Redox Biology. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 29 septembre 2020. Vol. 2020, pp. 8294158. DOI 10.1155/2020/8294158.

FRANZKE, Andreas, LYSAK, Martin A., AL-SHEHBAZ, Ihsan A., KOCH, Marcus A. et MUMMENHOFF, Klaus, 2011. Cabbage family affairs: the evolutionary history of Brassicaceae. *Trends in Plant Science*. février 2011. Vol. 16, n° 2, pp. 108-116. DOI 10.1016/j.tplants.2010.11.005.

FRENS, A.M., 1949. Experiments on the practical effect of giving methyl thiouracil to fattening cows. *Landbouwkundig Tijdschrift*. 1949. 19511401132

GENTILI, Alessandra, DE PRATTI, Valeria, CARETTI, Fulvia, PÉREZ-FERNÁNDEZ, Virginia, TOMAI, Pierpaolo, CURINI, Roberta et MAINERO ROCCA, Lucia, 2016. Residue analysis of thyreostats in baby foods via matrix solid phase dispersion and liquid chromatography – dual-polarity electrospray – tandem mass spectrometry. *Food Additives & Contaminants: Part A*. 1 décembre 2016. Vol. 33, n° 12, pp. 1793-1802. DOI 10.1080/19440049.2016.1241899.

HEEREMANS, An, PETEGHEM, Carlos Van, ERMENS, André, DE WASCH, Katia K. et DE BRABANDER, Hubert F., 1998. Elimination profile of methylthiouracil in cows after oral administration†. *The Analyst*. 1998. Vol. 123, n° 12, pp. 2629-2632. DOI 10.1039/a805113e.

HERVE JULIE, 2024. La fonction thyroïdienne. *UE 46, physiologie intégrée des grandes fonctions*. Polycopié d'enseignement. Nantes, Oniris. 18 mars 2024.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (éd.), 2001. *Some thyrotropic agents: this publication represents the views and expert opinions of an IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, which met in Lyon, 10 - 17 October 2000*. Lyon : IARC. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, 79. ISBN 978-92-832-1279-9.

ISAKOV, D et LAZIC, V, 1968. effect of methylthiouracil in final concentrate rations for fattening bullocks. . 1968.

JOURNAL OFFICIEL DE L'UNION EUROPÉENNE, [sans date]. L 248/32 : *Règlement d'exécution 2022/1646* [en ligne]. Disponible à l'adresse : <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32022R1646>

JOURNAL OFFICIEL DE L'UNION EUROPÉENNE, 2017. L 95/1 : *Règlement UE 2017-625* [en ligne]. Disponible à l'adresse : <http://data.europa.eu/eli/reg/2017/625/oj/fra>

JOURNAL OFFICIEL DE L'UNION EUROPÉENNE, 2021. L 180/84 : *Règlement d'exécution, 2021/808/UE*.

JOURNAL OFFICIEL DE L'UNION EUROPÉENNE, 2022. L 248/3 : *Règlement délégué 2022/1644* [en ligne]. Disponible à l'adresse : http://data.europa.eu/eli/reg_del/2022/1644/oj/fra

JOURNAL OFFICIEL DES COMMUNAUTÉS EUROPÉENNES, 1981. L 222/32 : *DIRECTIVE DU CONSEIL 81/602/EC*.

JOURNAL OFFICIEL DES COMMUNAUTÉS EUROPÉENNES, 1985. L 191 /46 : *DIRECTIVE DU CONSEIL 85/602/CEE*.

JOURNAL OFFICIEL DES COMMUNAUTÉS EUROPÉENNES, 1993. L 118/64 : *DÉCISION DE LA COMMISSION 93/256/CEE*.

JOURNAL OFFICIEL DES COMMUNAUTÉS EUROPÉENNES, 1996a. L 125/ 10 : *DIRECTIVE DU CONSEIL 96/23/CE*.

JOURNAL OFFICIEL DES COMMUNAUTÉS EUROPÉENNES, 1996b. L 125/3 : *Directive du Conseil 96/22/CE*.

JOURNAL OFFICIEL DES COMMUNAUTÉS EUROPÉENNES, 2002. L 221/8 : *DÉCISION DE LA COMMISSION 2002/657/CE*.

KAMPMANN, Jens P. et HANSEN, J. Mølholm, 1981. Clinical Pharmacokinetics of Antithyroid Drugs. *Clinical Pharmacokinetics*. 1 décembre 1981. Vol. 6, n° 6, pp. 401-428. DOI 10.2165/00003088-198106060-00001.

KAPLANERIS, Nikolaos, KOUTOULOGENIS, Giorgos, RAFTOPOULOU, Marianna et KOKOTOS, Christoforos G., 2015. 4-Fluoro and 4-Hydroxy Pyrrolidine-thioxotetrahydropyrimidinones: Organocatalysts for Green Asymmetric Transformations in Brine. *The Journal of Organic Chemistry*. 5 juin 2015. Vol. 80, n° 11, pp. 5464-5473. DOI 10.1021/acs.joc.5b00283.

KENNEDY, T. H. et PURVES, H. D., 1941. Studies on Experimental Goitre. I: The Effect of Brassica Seed Diets on Rats. *British Journal of Experimental Pathology*. octobre 1941. Vol. 22, n° 5, pp. 241-244.

KIEBOOMS, Julie A L, 2014. Endogenous formation of thiouracil in livestock: mechanistic and analytical aspects. . 2014.

KIEBOOMS, Julie A. L., VANDEN BUSSCHE, Julie, HEMERYCK, Lieselot Y., FIEVEZ, Veerle et VANHAECKE, Lynn, 2012. Intestinal Microbiota Contribute to the Endogenous Formation of Thiouracil in Livestock. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 15 août 2012. Vol. 60, n° 32, pp. 7769-7776. DOI 10.1021/jf3017145.

KIEBOOMS, Julie A. L., WAUTERS, Jella, VANDEN BUSSCHE, Julie, HOUF, Kurt, DE VOS, Paul, VAN TRAPPEN, Stefanie, CLEENWERCK, Ilse et VANHAECKE, Lynn, 2014. Thiouracil-Forming Bacteria Identified and Characterized upon Porcine *In Vitro* Digestion of Brassicaceae Feed. GRIFFITHS, M. W. (éd.), *Applied and Environmental Microbiology*. décembre 2014. Vol. 80, n° 23, pp. 7433-7442. DOI 10.1128/AEM.02370-14.

- KIEBOOMS, Julie A. L., WAUTERS, Jella, VANDEN BUSSCHE, Julie et VANHAECKE, Lynn, 2015. Validation of a quantitative method using liquid chromatography coupled to multiple mass spectrometry for thiouracil in feedstuffs used in animal husbandry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. juin 2015. Vol. 407, n° 15, pp. 4373-4384. DOI 10.1007/s00216-014-8347-x.
- LE BIZEC, Bruno, BICHON, Emmanuelle, DECEUNINCK, Yoann, PRÉVOST, Stéphanie, MONTEAU, Fabrice, ANTIGNAC, Jean-Philippe et DERVILLY-PINEL, Gaud, 2011. Toward a criterion for suspect thiouracil administration in animal husbandry. *Food Additives & Contaminants: Part A*. juillet 2011. Vol. 28, n° 7, pp. 840-847. DOI 10.1080/19440049.2011.565483.
- LINDSAY, R. H., HILL, J. B., KELLY, K. et VAUGHN, A., 1974. Excretion of propylthiouracil and its metabolites in rat bile and urine. *Endocrinology*. juin 1974. Vol. 94, n° 6, pp. 1689-1698. DOI 10.1210/endo-94-6-1689.
- MARTÍNEZ-FRÍAS, M.L., CEREIJO, A., RODRÍGUEZ-PINILLA, E. et URIOSTE, M., 1992. Methimazole in animal feed and congenital aplasia cutis. *The Lancet*. mars 1992. Vol. 339, n° 8795, pp. 742-743. DOI 10.1016/0140-6736(92)90640-O.
- MERCIER, Christine, 1983. *Le problème des antithyroïdiens en élevages*. Paris : Thèse pour le doctorat vétérinaire, école national vétérinaire Alfort.
- MISHANINA, Tatiana V., KOEHN, Eric M. et KOHEN, Amnon, 2012. Mechanisms and inhibition of uracil methylating enzymes. *Bioorganic Chemistry*. août 2012. Vol. 43, pp. 37-43. DOI 10.1016/j.bioorg.2011.11.005.
- NAMBIAR, Prashant R., PALANISAMY, Gopinath S., OKERBERG, Carlin, WOLFORD, Angela, WALTERS, Karen, BUCKBINDER, Leonard et REAGAN, William J., 2014. Toxicities associated with 1-month treatment with propylthiouracil (PTU) and methimazole (MMI) in male rats. *Toxicologic Pathology*. août 2014. Vol. 42, n° 6, pp. 970-983. DOI 10.1177/0192623313502708.
- PARIS, A., ANDRE, F., ANTIGNAC, J.P., LE BIZEC, B., BONNEAU, M., BRIANT, C., CARATY, A., CHILLIARD, Y., COGNIE, Y., COMBARNOUS, Y., CRAVEDI, J.P., FABRE-NYS, C., FERNANDEZ-SUAREZ, A., FOSTIER, A., HUMBLLOT, P., LAUDET, V., LEBOEUF, B., LOUVEAU, I., MALPAUX, B., MARTINAT-BOTTE, F., MAUREL, M.C., PELICER-RUBIO, M.T., PICARD-HAGEN, N., PINAULT, L., PINEL, G., PONSARD, C., POPOT, M.A., SCHMIDELY, P., TOUTAIN, P.L. et ZALCO, D., 2006. Hormones et promoteurs de croissance en productions animales : de la physiologie à l'évaluation du risque. *INRAE Productions Animales*. 13 mai 2006. Vol. 19, n° 3, pp. 151-240. DOI 10.20870/productions-animales.2006.19.3.3491.
- PINEL, G., MATHIEU, S., CESBRON, N., MAUME, D., DE BRABANDER, H. F., ANDRE, F. et LE BIZEC, 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 and Contaminants*. octobre 2006. Vol. 23, n° 10, pp. 974-980. DOI 10.1080/02652030600806370.
- PINEL, G., WEIGEL, S., ANTIGNAC, J. -P., MOONEY, M. H., ELLIOTT, C., NIELEN, M. W. F. et LE BIZEC, B., 2010. Targeted and untargeted profiling of biological fluids to screen for anabolic practices in cattle. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 1 décembre 2010. Vol. 29, n° 11, pp. 1269-1280. DOI 10.1016/j.trac.2010.06.010.
- PINEL, Gaud, BICHON, Emmanuelle, POUPONNEAU, Karine, MAUME, Daniel, ANDRÉ, François et LE BIZEC, Bruno, 2005. Multi-residue method for the determination of thyreostats in urine samples using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry after derivatisation with 3-

iodobenzylbromide. *Journal of Chromatography A*. septembre 2005. Vol. 1085, n° 2, pp. 247-252. DOI 10.1016/j.chroma.2005.06.055.

PINEL, Gaud, MAUME, Daniel, DECEUNINCK, Yoann, ANDRE, François et LE BIZEC, Bruno, 2006. Unambiguous identification of thiouracil residue in urine collected in non-treated bovine by tandem and high-resolution mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 15 novembre 2006. Vol. 20, n° 21, pp. 3183-3187. DOI 10.1002/rcm.2711.

POCHARD, Marie-France, 1983. Contrôle des résidus de thyrostatiques dans la thyroïde et le muscle du bovin. Recherche et dosage dans les aliments. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*. 1983. Vol. 136, n° 1, pp. 73-82. DOI 10.4267/2042/65269.

POHLSCHMIDT, J et FORSCHNER, E, 1979. Dunnschichtchromatographischer nachweis von methythyouracil (MTU) in blutserum und muskelsaft von mastrindern. . 1979. Vol. FLEISCHWIRTSCHAFT.

PONS, Frédéric, [sans date]. Dans le Sud-Ouest, des veaux trop beaux pour être honnêtes. *Libération* [en ligne]. [Consulté le 5 avril 2024]. Disponible à l'adresse : https://www.liberation.fr/futurs/2006/01/28/dans-le-sud-ouest-des-veaux-trop-beaux-pour-etre-honnetes_28140/

PRÉVOST, Stéphanie, SÉRÉE, Ludivine, SITTISACK, Parina, DERVILLY-PINEL, Gaud, LE BIZEC, Bruno et FOURNET, Isabelle, 2014. Le dispositif de contrôle des promoteurs de croissance. *Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation no 77/Numéro spécial – Surveillance sanitaire des aliments*. 2014.

Protocole: PROMOTEURS DE CROISSANCE DANS L'URINE DÉTECTION ET IDENTIFICATION DE THYRÉOSTATIQUES PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE COUPLÉE À LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE EN TANDEM, LABERCA/T-u.1.04, 2021d. .

RAYNAUD, J.-P. et RUCKEBUSCH, Yves, 1987. Problèmes liés à l'usage des produits d'intervention et des améliorateurs de performance en élevage intensif. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*. 1987. Vol. 140, n° 4, pp. 469-482. DOI 10.4267/2042/64906.

RIKILT WAGENINGEN, 2014. *EURL Reflection paper: Natural growth promoting substances in biological samples*. Wageningen.

SACHS, C., TEBACHER-ALT, M., MARK, M., CRIBIER, B. et LIPSKER, D., 2016. Aplasie cutanée congénitale et antithyroïdiens de synthèse au cours de la grossesse : série de cas et revue de la littérature. *Annales de Dermatologie et de Vénérologie*. juin 2016. Vol. 143, n° 6-7, pp. 423-435. DOI 10.1016/j.annder.2016.02.018.

SARCIONE, Edward J. et SOKAL, Joseph E., 1958. DETOXICATION OF THIOURACIL BY S-METHYLATION. *Journal of Biological Chemistry*. 1 avril 1958. Vol. 231, n° 2, pp. 605-608. DOI 10.1016/S0021-9258(18)70426-2.

SCHILT, R., WESEMAN, J.M., HOOIJERINK, H., KORBEE, H.J., TRAAG, W.A., VAN STEENBERGEN, M.J. et HAASNOOT, W., 1989. Screening and confirmation of thyreostatics in urine by gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection and gas chromatography-mass spectrometry after sample clean-up with a mercurated affinity column. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. avril 1989. Vol. 489, n° 1, pp. 127-137. DOI 10.1016/S0378-4347(00)82890-X.

SÉNÉCAT, Odile, 2023. *Hyperthyroïdie du chat, Pathologie des Carnivores, UE 87, Ecole Nationale Vétérinaire, Oniris, Nantes*. 2023.

SHAHID, Muhammad A., ASHRAF, Muhammad A. et SHARMA, Sandeep, 2024. Physiology, Thyroid Hormone. In : *StatPearls* [en ligne]. Treasure Island (FL) : StatPearls Publishing. [Consulté le 14 avril 2024]. Disponible à l'adresse : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500006/NBK500006>

SHIROOZU, A., TAUROG, A., ENGLER, H. et DORRIS, M. L., 1983. Mechanism of action of thioureylene antithyroid drugs in the rat: possible inactivation of thyroid peroxidase by propylthiouracil. *Endocrinology*. juillet 1983. Vol. 113, n° 1, pp. 362-370. DOI 10.1210/endo-113-1-362.

SITE DU COLLÈGE NATIONAL DE PHARMACOLOGIE MÉDICALE, 2022. Antithyroïdiens de synthèse. *Pharmacomédicale.org* [en ligne]. 2022. Disponible à l'adresse : <https://pharmacomedicale.org/medicaments/par-specialites/item/antithyroïdiens-de-synthese>

SKOUPÁ, Kristýna, ŠŤASTNÝ, Kamil et SLÁDEK, Zbyšek, 2022. Anabolic Steroids in Fattening Food-Producing Animals—A Review. *Animals*. 18 août 2022. Vol. 12, n° 16, pp. 2115. DOI 10.3390/ani12162115.

TANGL, H., KUNFFY, Z. et FARKAS, M., 1967. Effect of methylthiouracil on the fattening of beef cattle and on the quality of the meat. *Acta Agronomica Hungarica* [en ligne]. 1967. Vol. 16, 313-319. Disponible à l'adresse : <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/19681405879Res>. Inst. Animal Breeding, Budapest

THEODORIDIS, Alexandros, VOURAKI, Sotiria, MORIN, Emmanuel, RUPÉREZ, Leticia Riaguas, DAVIS, Carol et ARSENOS, Georgios, 2021. Efficiency Analysis as a Tool for Revealing Best Practices and Innovations: The Case of the Sheep Meat Sector in Europe. *Animals*. novembre 2021. Vol. 11, n° 11, pp. 3242. DOI 10.3390/ani11113242.

TÖLGYESI, Ádám, GIRI, Anupam, BARTA, Eniko, MCDONALD, Thomas J. et SHARMA, Virender K., 2018. Determination of Thyreostats in Urine Using Supported Liquid Extraction and Mixed-Mode Cation-Exchange Solid-Phase Extraction: Screening and Confirmatory Methods. *Journal of Chromatographic Science*. 1 octobre 2018. Vol. 56, n° 9, pp. 858-866. DOI 10.1093/chromsci/bmy054.

VAN MEULEBROEK, Lieven, WAUTERS, Jella, POMIAN, Beata, VANDEN BUSSCHE, Julie, DELAHAUT, Philippe, FICHANT, Eric et VANHAECKE, Lynn, 2018a. Discovery of urinary biomarkers to discriminate between exogenous and semi-endogenous thiouracil in cattle: A parallel-like randomized design. *PloS One*. 2018. Vol. 13, n° 4, pp. e0195351. DOI 10.1371/journal.pone.0195351.

VAN MEULEBROEK, Lieven, WAUTERS, Jella, POMIAN, Beata, VANDEN BUSSCHE, Julie, DELAHAUT, Philippe, FICHANT, Eric et VANHAECKE, Lynn, 2018b. Discovery of urinary biomarkers to discriminate between exogenous and semi-endogenous thiouracil in cattle: A parallel-like randomized design. LOOR, Juan J (éd.), *PLOS ONE*. 12 avril 2018. Vol. 13, n° 4, pp. e0195351. DOI 10.1371/journal.pone.0195351.

VANDEN BUSSCHE, J., NOPPE, H., VERHEYDEN, K., WILLE, K., PINEL, G., LE BIZEC, B. et DE BRABANDER, H.F., 2009. Analysis of thyreostats: A history of 35 years. *Analytica Chimica Acta*. avril 2009. Vol. 637, n° 1-2, pp. 2-12. DOI 10.1016/j.aca.2008.08.027.

VOS, J. G., STEPHANY, R. W., CASPERS, J. W., VAN LOON, J. Th. G., METZLAR, J. W. H. et OVERHAUS, H. B. M., 1982. Weight increase of the thyroid gland as a tentative screening parameter to detect the

illegal use of thyreostatic compounds in slaughter cattle. *Veterinary Quarterly*. janvier 1982. Vol. 4, n° 1, pp. 1-4. DOI 10.1080/01652176.1982.9693830.

WAGENINGEN FOOD SAFETY RESEARCH, 2022. *EURL Reflection paper 2.0* [en ligne]. Disponible à l'adresse : <https://edepot.wur.nl/606740>

WAUTERS, J., VAN MEULEBROEK, L., FICHANT, E., DELAHAUT, P. et VANHAECKE, L., 2017. Discrimination between Synthetically Administered and Endogenous Thiouracil Based on Monitoring of Urine, Muscle, and Thyroid Tissue: An in Vivo Study in Young and Adult Bovines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2 août 2017. Vol. 65, n° 30, pp. 6231-6239. DOI 10.1021/acs.jafc.7b01920.

WAUTERS, Jella, VANDEN BUSSCHE, Julie, BIZEC, Bruno Le, KIEBOOMS, Julie A. L., DERVILLY-PINEL, Gaud, PREVOST, Stéphanie, WOZNIAK, Barbara, STERK, Saskia S., GRØNNINGEN, Dag, KENNEDY, D. Glenn, RUSSELL, Sandra, DELAHAUT, Philippe et VANHAECKE, Lynn, 2015. Toward a New European Threshold to Discriminate Illegally Administered from Naturally Occurring Thiouracil in Livestock. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 11 février 2015. Vol. 63, n° 5, pp. 1339-1346. DOI 10.1021/jf504475f.

WITEK, Sebastian, WOZNIAK, Barbara, MATRASZEK-ZUCHOWSKA, Iwona et POSYNIAK, Andrzej, 2018. Analysis of thyreostats in bovine feces using ultra high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Separation Science*. mars 2018. Vol. 41, n° 5, pp. 1083-1090. DOI 10.1002/jssc.201701069.

WOŹNIAK, B., WITEK, S., MATRASZEK-ŻUCHOWSKA, I., SELL, B. et POSYNIAK, A., 2021. The effect of diet enriched with rapeseed meal on endogenous thiouracil contents in urine of calves. *Research in Veterinary Science*. 1 mai 2021. Vol. 136, pp. 192-197. DOI 10.1016/j.rvsc.2020.10.021.

WOŹNIAK, Barbara, MATRASZEK-ŻUCHOWSKA, Iwona, SIELSKA, Katarzyna, WITEK, Sebastian, POSYNIAK, Andrzej, NIEMCZUK, Krzysztof et ŻMUDZKI, Jan, 2018. Control of Residues of Thyreostats in Slaughter Animals in Poland in 2011–2017. *Journal of Veterinary Research*. 31 décembre 2018. Vol. 62, n° 4, pp. 511-517. DOI 10.2478/jvetres-2018-0077.

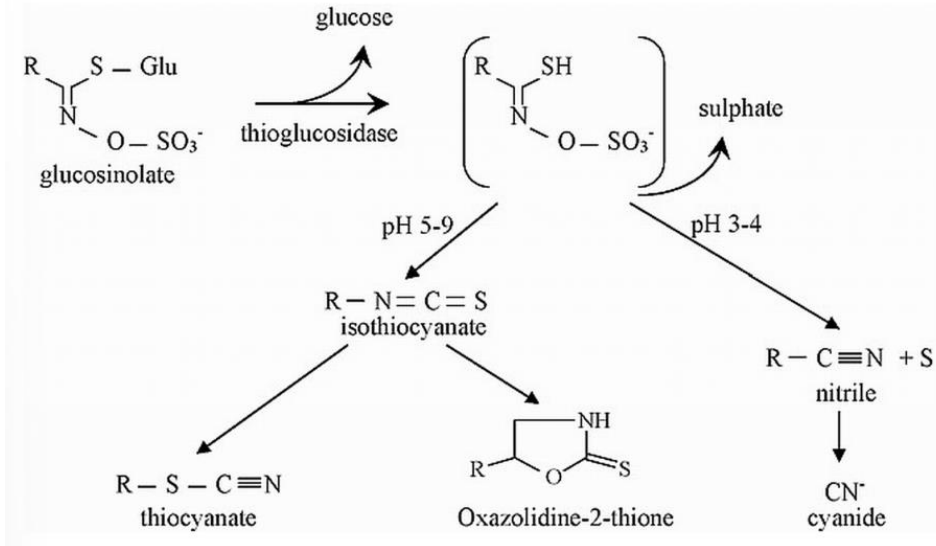
WOŹNIAK, Barbara, WITEK, Sebastian, ŻMUDZKI, Jan et KŁOPOT, Alicja, 2012. Natural Occurrence of Thiouracil in Urine of Livestock in Poland. *Journal of Veterinary Research*. 1 décembre 2012. Vol. 56, n° 4, pp. 611-615. DOI 10.2478/v10213-012-0108-z.

YOSHIHARA, Aya, LUO, Yuqian, ISHIDO, Yuko, USUKURA, Kensei, ODA, Kenzaburo, SUE, Mariko, KAWASHIMA, Akira, HIROI, Naoki et SUZUKI, Koichi, 2019. Inhibitory effects of methimazole and propylthiouracil on iodotyrosine deiodinase 1 in thyrocytes. *Endocrine Journal*. 25 avril 2019. Vol. 66, n° 4, pp. 349-357. DOI 10.1507/endocrj.EJ18-0380.

ZUKALOVÁ, H. et VAŠÁK, J., 2002. The role and effects of glucosinolates of Brassica species - a review. *Plant, Soil and Environment*. 30 avril 2002. Vol. 48, n° 4, pp. 175-180. DOI 10.17221/4217-PSE.

Annexe

Annexe 1 : Représentation de l'hydrolyse des glucosinolates due à une enzyme, la myrosinase (Vanden Bussche et al. 2009)



Annexe 2 : Feuille de critères d'identification (2002/657/CE) pour les analyses de confirmation par chromatographie couplée à la spectrométrie de masse.

Date	29/02/2024	GC-EI-MS	GC-CI-MS	GC-HR-MS	GC-MS/MS	LC-MS/MS		
Appareil	Xevo 1					XXXXXXXXXXXX		
Analyte :	2-TU	Ajout	Echantillon	Echantillon	Echantillon	Echantillon	Echantillon	
Matrice :	Urine							
Références Echantillons		Ajout 5	27	33	37	39	46	54
Tr Etalon	DMTU	5,460	5,450	5,450	5,450	5,450	5,460	5,460
Tr Analyte		3,050	3,050	3,050	3,050	3,050	3,050	3,050
Tr Analyte / Tr Etalon		0,559	0,560	0,560	0,560	0,560	0,559	0,559
Tolérance Tr	+/- (%) 2,5	0,545 0,573	IN	IN	IN	IN	IN	IN
Abondance Etalon		6224678	3419985	3206786	3735884	3710161	4380916	3153568
Abondance signal 1 (PB)	345 > 217	35053028	118300168	51977428	48911460	1860584	29710426	1667655
Abondance signal 2	345 > 90	8955484	50503984	14495659	13956900	512760	8622676	487036
Abondance signal 3	>							
Abondance signal 4	>							
Rapport 1 (signal 2 / signal 1)		0,255	0,427	0,279	0,285	0,276	0,290	0,292
Tolérance Rapport 1	+/- (%) 25	0,192 0,319	OUT	IN	IN	IN	IN	IN
Rapport 2 (signal 3 / signal 1)								
Tolérance Rapport 2	+/- (%)							
Rapport 3 (signal 4 / signal 1)								
Tolérance Rapport 3	+/- (%)							
Points d'identification			2,5	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
Conclusion			PRESENCE NON CONFIRMEE	PRESENCE CONFIRMEE	PRESENCE CONFIRMEE	PRESENCE CONFIRMEE	PRESENCE CONFIRMEE	PRESENCE CONFIRMEE
Concentration estimée	Unité : ppb	15,00	92,14	43,17	34,87	1,34	18,06	1,41
Commentaires								

Informations générales à saisir Signaux à saisir Calcul/Conclusion automatique

Annexe 3 : Feuille de quantification pour les analyses de confirmation par chromatographie couplée à la spectrométrie de masse

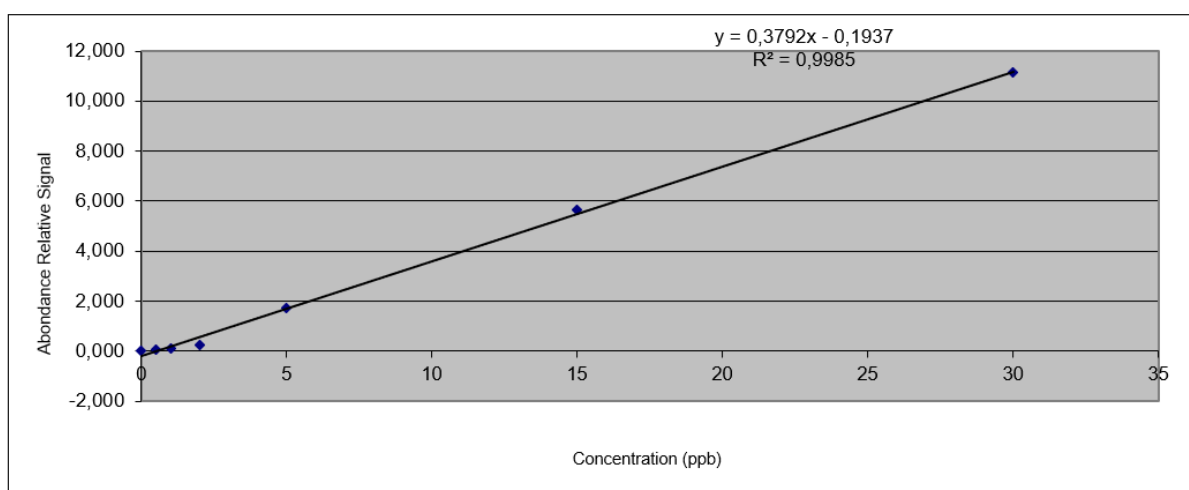
Date retraitement	11/03/20024
-------------------	-------------

Technique	LABERCA/T-u.1.04
Appareil	Xevo1

Analyte	2-TU
Signal	345 > 217

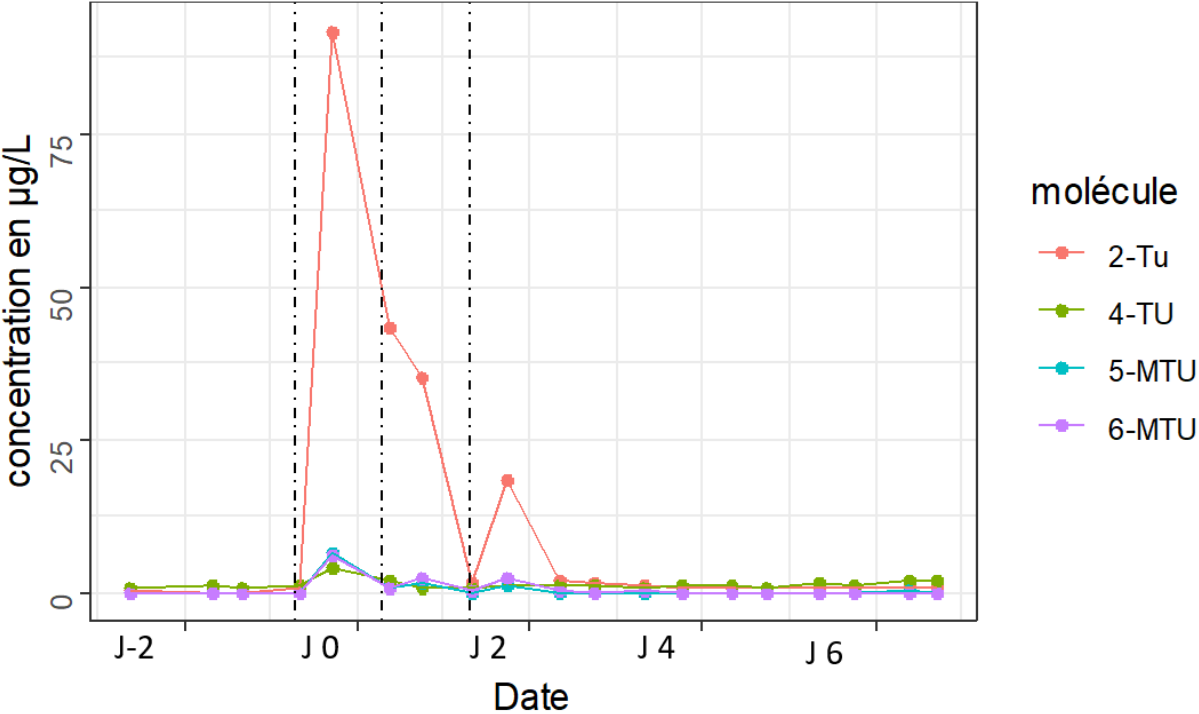
Etalon int.	DMTU
Signal	373 > 217

Concentration (ppb)	Etalon Interne		Analyte				Paramètres de régression		
	Tr (min)	Amplitude Signal	Tr (min)	Amplitude Signal	Tr Rel.	Signal Relatif	penne (a)	Ordonnée à l'origine (b)	R ²
0	5,45	6190244	3,05	15574	0,560	0,003	0,3792	-0,1937	0,9985
0,5	5,45	6044663	3,05	397699	0,560	0,066			
1	5,45	6811904	3,05	879501	0,560	0,129			
2	5,45	6024474	3,05	1522878	0,560	0,253			
5	5,46	6411697	3,05	11005670	0,559	1,716			
15	5,46	6224678	3,05	35053028	0,559	5,631			
30	5,45	5767489	3,05	64206944	0,560	11,133			



Echantillon	5	26	27	33	37	39	46	54
Abondance Etalon	6394348	3421874	3419985	3206786	3735884	3710161	4380916	3153568
Abondance Analyte	11975	197604	118300168	51977428	48911460	1860584	29710426	1667655
Abondance Analyte Relative	0,002	0,058	34,591	16,209	13,092	0,501	6,782	0,529
Concentration estimée (ppb)	0,52	0,66	91,73	43,26	35,04	1,83	18,40	1,91

Annexe 4 : courbe d'élimination urinaire du 2-TU, 4-TU, 5-MTU et 6-MTU chez une brebis traitée (droite en pointillé : administration de 0,2 g/100kg de PV de 2-TU)



Nathan DOZIAS

TITRE DE LA THÈSE : IDENTIFICATION CHEZ LES OVINS D'UN MARQUEUR D'EXPOSITION INTERNE SIGNANT L'ORIGINE ILLEGALE DU THIOURACILE.

IDENTIFICATION IN SHEEP OF AN INTERNAL EXPOSURE MARKER INDICATING THE ILLEGAL ORIGIN OF THIOURACIL.

Thèse d'État de Doctorat Vétérinaire : Nantes, le 30 septembre 2024

RESUME :

Le thiouracile (2-TU), principal antithyroïdien de synthèse (ATS), fut l'objet d'utilisations illégales en élevage dans le but d'augmenter la croissance des animaux de production. Les ATS sont interdits d'usage au sein de l'Union Européenne depuis 1981. La possible présence endogène de thiouracile dans l'urine des animaux de production rend difficile la déclaration de conformité d'un échantillon. La recherche de biomarqueurs spécifiques de l'usage frauduleux du thiouracile est donc cruciale. Notre étude vise à évaluer la pertinence du 6-MTU comme marqueur diagnostique de l'usage de 2-TU chez les ovins. Les cinétiques d'élimination urinaire de 2-TU, 4-TU, 5-MTU et 6-MTU chez deux ovins traités avec 2 et 0,2 g/100 kg de PV de thiouracile par voie orale ont été étudiées par LC-MS/MS. Du 6-MTU a été détecté dans l'urine des brebis traitées 8 h après la première administration et jusqu'à 48 h post-administration. L'étude rétrospective de 200 échantillons d'urine d'ovins provenant de plans de surveillance a démontré l'absence de 6-MTU dans l'urine physiologique d'ovin. Cette étude confirme l'intérêt du 6-MTU comme biomarqueur discriminant une administration de thiouracile chez les ovins.

MOTS CLES :

- Thiouracile
- Biomarqueur
- Thyroéstatique
- Résidu
- Ovin
- Spectrométrie de masse

DATE DE SOUTENANCE : 30 Septembre 2024