Résidus marqueurs de colorants dans les poissons d'aquaculture: étude du métabolisme des colorants chez le poisson par des modèles in vitro et in vivo

Estelle Dubreil-Cheneau

▶ **To cite this version:**

Estelle Dubreil-Cheneau. Résidus marqueurs de colorants dans les poissons d'aquaculture: étude du métabolisme des colorants chez le poisson par des modèles in vitro et in vivo. Médecine vétérinaire et santé animale. Unievrsité de Rennes 1, 2020. Français. NNT : . tel-03203028

HAL Id: tel-03203028

https://anses.hal.science/tel-03203028

Submitted on 20 Apr 2021

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.

Copyright

DOCTORAT BIOLOGIE BRETAGNE SANTE LOIRE

UNIVERSITÉ DE RENNES 1

anses

Thèse de doctorat de

L'UNIVERSITE DE RENNES 1

ECOLE DOCTORALE N° 605
Biologie Santé
Spécialité : « *Santé publique* »

Par

Estelle DUBREIL

Résidus marqueurs de colorants dans les poissons d'aquaculture: étude du métabolisme des colorants chez le poisson par des modèles *in vitro* et *in vivo*

Thèse présentée et soutenue à Fougères par visioconférence, le 27 novembre 2020
Unité de recherche : Analyse de Résidus et Contaminants, ANSES – Laboratoire de Fougères

Rapporteurs avant soutenance :

Frédérique COURANT	Maitre de conférence – Université de Montpellier
Cyril FEIDT	Professeur – Université de Lorraine

Composition du Jury :

Président :	
Bruno LE BIZEC	Professeur – ONIRIS LABERCA
Examinateurs :	
Delphine ALLORGE	Professeur – CHRU Lille
Frédérique COURANT	Maitre de conférence – Université de Montpellier
Cyril FEIDT	Professeur – Université de Lorraine
Thierry MORIN	Ingénieur de Recherche – ANSES
Directeur de thèse :	
Eric VERDON	Directeur de Recherche – ANSES

Invitée :

Wendy ANDERSEN	Chargée de Recherche – FDA- Denver USA

~Remerciements~

Que d'années passées auprès de vous, 16 ans, c'est long, mais finalement c'est passé très vite! Vous êtes une vraie famille, me donnant envie de venir travailler chaque jour, de partager, et d'échanger. Nous avons vécu de beaux moments ensemble dans ce labo ou à l'extérieur, des projets, des naissances, des analyses et des spectros, des noëls, des réunions, des départs en retraite, des pannes d'instruments, des pauses cafés en discutant de tous les sujets, des pauses bureau, des moments délicats, des congrès, un déménagement, des questionnements scientifiques, des galettes-saucisses… vive la suite des aventures: MERCI à tous. Depuis tout ce temps, c'est compliqué de n'oublier personne dans mes remerciements, et aussi de devoir respecter un ordre de citation car vous comptez tous autant, mais je vais me prêter au jeu (d'autant plus que ces trois pages seront les plus lues…).

↳ Vous m'avez fait confiance :

Pascal, je te remercie sincèrement de m'avoir adoptée au laboratoire, et pour ton écoute et ta bienveillance au quotidien envers tous et depuis tant d'années de direction. Merci de m'avoir proposé de l'aide pour la VAE, ça m'a beaucoup touché. Et plus récemment, Tahar, je te remercie également d'avoir suivi mon dossier, et de ne rien lâcher au quotidien, au travail comme au sport (c'est super) !

Eric, un grand Merci ! Pas facile de suivre ma thèse alors que nous travaillons ensemble depuis longtemps, de me laisser toute l'autonomie tout en m'encourageant quand il le fallait. Tu as très bien réussi. Toutes les réunions, les corrections, et les discussions m'ont été profitables. Merci de m'avoir soutenue pour tenter l'aventure Denver, ce sera pour une prochaine fois je l'espère. J'apprécie aussi ton positivisme envers tout notre travail, je ne t'ai jamais vu dévaloriser qui que ce soit, une exemplarité à suivre.

Dominique, tu as su me faire évoluer, me faire confiance pour que je franchisse cette étape, et me donner du temps ! J'ai beaucoup apprécié les temps d'échanges que nous avons eu au bureau pendant 7 ans. Je te remercie pour tout, ainsi que pour ta gestion stimulante de l'unité, et la confiance que tu nous accordes à tous, tes bébés (agents, et spectros ☺).

Michel, j'aimerais être comme toi (non pas la barbe), no stress même débordé! c'est sûrement grâce à l'accent. Mille mercis pour le temps que tu m'as consacré, combien de réunions de PK ? Mon premier article c'était avec toi, et le tout dernier aussi tiens! L'erreur n'a pas été totale du tout, mais l'approche fort sympathique.

↳Vous avez contribué aux résultats et aux manips, de près ou de loin, merci :

-Mes stagiaires de master : Vincent, Luc, et Gaël ! 3 numéros différents, mais on dirait que j'ai choisi le bon pour chaque sujet, le trio gagnant. Sans vous c'était donc perdu. Je vous remercie car vous m'avez apporté autant que ce que j'ai essayé de vous apporter (enfin je l'espère).

-Morgane, pour les deux manips truites, gestion parfaite,

-Jean-Guy pour les prélèvements sur les truites de Galaché, et Michel ! C'était sport..

-Jean-Michel pour la partie analytique de l'étude PK. Je me souviendrai du moulin à café, la solution ultime à la peau de poisson. Toujours passionné par ton travail, et prêt à me rendre

service, jusqu'au dernier jour avant la retraite. Ton accent du sud tout en parlant plongées me manquent. Merci !

- Yann G. (Laberca) et Sophie M., experts en métabo-stats, mille mercis d'avoir passé du temps sur mes données.

- the FFPW, the Czech team (Viktoria, Saskia, Vladimir), many many thanks for your welcoming in Vodnany to your great lab, full of memories for me, the beers, the frozen lake, the preparation of the microsomes, the visit of the hatcheries, and your sense of hospitality. Hope to come back!

-Wendy, a huge thank to you, you saved me when I almost slept on the streets in Denver! thanks for your hospitality, the escape in the red rocks of Colorado, the visit of your great FDA-lab, your transmission of your passion on dyes chemistry… I hope that we can strengthen our collaboration. You are welcome to visit Brittany.

↳L'Unité A(-mitié)R(-igueur)C(-omposition), ma proche « famille » :

Yvette (sourire rayonnant et gentillesse), Mélaine (patience et soutien à toute épreuve), Sophie G. (ronchonneuse car perfectionniste, avec un cœur énorme), Marie-Pierre L. (toujours bienveillante), Pierre (Pierrot le rigolo, il en faut toujours un dans l'équipe, mais attention le travail c'est le travail, la thèse c'est pour toi, je te passe le relai), Robin (aussi bavard qu'allemand, ok cool-chek !), Marie-Pierre CS. (calme, gentillesse et rigueur), Estelle Dr. (la réussite aux Estelle et aux blondes ☺, déjà Dr. en fait, ça ne m'étonne pas), Gaël (déterminé, bosseur et très sympa, tu iras loin), Pierrick (dévoué et toujours prêt à donner un coup de main en urgence, merci), notre Kahina partie sous d'autres labos-cieux (ton sourire permanent, malgré les épreuves, toujours un mot gentil), Murielle et Sophie M. (j'adore venir dans votre bureau pour échanger scientifiquement ou perso, on est toujours bien accueillis, mille mercis), Dominique (notre chef-mère en or).

↳Mes ami(e)s, mercis :

Rachelle, ma pétillante brune et the first one, je sais que je peux compter sur toi, mojitos-apéros et discussions-rires à n'en plus finir sont des moments de purs plaisirs, merci pour ton soutien dans les moments difficiles, je te souhaite tout le bonheur ; Agnès, notre modèle (grande brune intelligente, qui a tout réussi) et ancienne copine de bureau, peut-être un jour… Lisa, pour le tri de M&M's par couleurs et autres blagues, ton hospitalité quand je suis à la porte, ton vin d'anjou et autres (une jeune qui a bon goût), et ton rire (dans la boite ☺). Alexis, ours ou nounours, ça dépend avec qui, taquin pour faire surgir l'intelligence, intègre par excellence, je sais que je peux compter sur toi. Ludo, tu as toujours été là, ça a démarré par le covoit en 205 et saxo, puis toutes les soirées à l'ACS, tes blagues presque toujours drôles, les CYP450 et notre petit Jimmy devenu grand, ton soutien en passant par mon bureau tous les jours pendant la thèse, notamment en essayant de me faire comprendre la tox… et j'en passe ;-). Valérie, l'acharnée de boulot, généreuse dans l'âme et rire explosif, ta porte est toujours ouverte, merci, n'oublie pas que la mienne l'est aussi. Jimmy, futur très grand scientifique, qu'est-ce que j'ai apprécié travailler avec toi ! à défaut de pouvoir parler de foot ou d'arts martiaux (☺), mais métabolisme et chimie. Que de regrets que tu aies préféré l'aventure BfR (je ne comprends pas que tu préfères les Berlinoises aux Fougeraises !!!), mais merveilleux souvenirs. Sylvie H., toujours joviale et empathique, de ma vie à Acigné et nos essais de course à pied, tu as toujours compté, malgré la distanciation des années.

↳ Mes acolytes du pump, c'est toujours un plaisir de partir souffrir avec vous, décompression totale (alors pause stop boulangerie ou non ?) : Alexis (tu peux charger plus!), Robin (tu peux charger moins!), Mireille, Tahar, MicP, Charlotte (une fois sur 10), Mickaëlle.

↳Et tout le labo : Régine (j'apprécie nos discutions très diverses), Antoine et Jérome alias Tic et Tac (toujours à l'écoute, toujours présents au bon moment! merci de m'avoir soutenu également), Fabrice (je te souhaite un avenir plein de spectros), Kevin , Mireille (ou maman-Mireille, ou Mme H&S, quelqu'un sur qui compter tous les soirs jusqu'à 20h minimum et dans n'importe quelle circonstance), Nathalie (pour ton soutien lors de l'inscription vae), toute l'équipe AB2R (j'apprécie de discuter avec vous tous au café notamment).

↳Nos soutiens au quotidien, toujours prêts à aider même dans l'urgence : Alain, Sylvie J., Yohann, Hélène (merci pour la mise en forme, j'en pouvais plus) et Marie-Pierre L. (bientôt la retraite méritée), Frédéric, Gaëtan, François, Sarah, Alexia, Lucie.

↳Les retraité(e)s, pour tous vos conseils (jardinage, thermomix, enfants, etc) et nos conversations : Jean-Michel, Brigitte (malgré ta discrétion, j'ai beaucoup appris avec toi sur les activités LNR, merci), Jean-Pierre, Pierre M., les Catherine, Gégé, Jacqueline, Bruno, Marie-Hélène, Hélène, Anne, les Chantal, Rachel, les Annick, Martine, Bernard mon mentor, Roselyne, Danièle ; Et les anciens stagiaires et thésards notamment : Jimmy, Benjamin, Adeline, Dong Mei, Khaled, Pierre-Jean, Pegah, Khaled, Isabau, Rym, David R., Juju, Steph et Manue (il y a très longtemps).

↳Je remercie sincèrement les membres du jury de me faire l'honneur d'examiner mon travail. A l'heure très incertaine à laquelle j'écris ces pages, je me demande si je pourrai discuter avec vous en présentiel le jour J.

A toute ma famille, mes proches et mes amis,

A ma mère et mon père, et mon frère Olivier, je vous dois cette vie épanouie, grâce à votre gentillesse et votre soutien. A Tony, mon mari, et mes enfants Victor et Norman dont je suis très fière, merci pour votre amour, votre joie de vivre au quotidien, tout le bonheur que vous m'apportez, merci de m'avoir encouragée et supportée (par moments) pendant tout ce travail.

A Papy Lulu,

Table des matières

Liste des abréviations 9
Liste des figures 12
Liste des tableaux 14

Introduction 15

Partie I : Synthèse bibliographique 18

1 Les résidus de colorants dans les produits d'aquaculture 19
1.1 L'aquaculture en constante progression 19
1.1.1 Le poisson, une source essentielle de nourriture pour l'Homme 19
1.1.2 L'Asie, principal producteur de produits d'aquaculture 20
1.1.3 La France, troisième producteur en Europe 21
1.2 Des maladies aquacoles aux résidus de médicaments 22
1.2.1 La production intensive aquacole : source de stress 23
1.2.2 L'aquaculture affectée par une multitude de maladies 24
1.2.3 Les traitements peuvent conduire à des résidus dans les aliments 25
1.3 Les résidus de colorants 26
1.3.1 Présentation des principales familles de colorants 27
1.3.2 Efficacité et usages des TAMs en aquaculture 32
1.3.3 Métabolisme et Toxicité des TAMs 36

2 La surveillance des résidus de colorants dans les denrées alimentaires 53
2.1 La réglementation internationale et européenne sur les traitements par des colorants dans les élevages aquacoles 53
2.2 Les méthodes analytiques de contrôle pour la confirmation des résidus de colorants dans les denrées issues de l'aquaculture 57
2.2.1 Instrumentation : le couplage usuel 58
2.2.2 Des méthodes exigeantes pour la confirmation de certains résidus tels que MG, CV, et leurs métabolites (avec ou sans oxydation) 60
2.2.3 Méthodes multi-colorants et multi-familles de colorants 64
2.2.4 La HRMS au service de la détection de multi-classes de résidus 74
2.3 Performances et validation des méthodes d'analyse de résidus de substances interdites telles que les colorants 76
2.3.1 L'Identification primordiale des substances interdites 79
2.3.2 L'importance d'une quantification suffisamment exacte 81

3 Données d'occurrence associées des colorants dans les poissons d'élevage et perspectives de recherche 86
3.1 Une surveillance assurée au quotidien par les Plans Nationaux de Contrôle des Résidus (National Residue Monitoring Plans, NRMPs) 87
3.1.1 Obligations 87
3.1.2 Importations hors UE 87
3.1.3 Résultats des plans en 2015, 2016, 2017 87
3.2 Un système européen d'alerte rapide: RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed) 88
3.2.1 Inspection des produits de la pêche aux frontières de l'UE (Postes d'Inspection Frontaliers, PIFs) 88
3.2.2 Les alertes RASFF 89
3.2.3 Les données d'études scientifiques confortent ces résultats 91
3.2.4 Conclusions et perspectives de recherche 94
4 La métabolomique comme outil pour l'évolution des méthodes d'analyses : recherche de biomarqueurs de traitement 96
4.1 Le métabolome, définition et principe 97
4.2 La métabolomique non ciblée pour l'étude de l'endo-métabolome 102
4.2.1 Workflow pré-analytique 103
4.2.2 Analyse et traitement de données 108
4.3 Profilage de métabolites exogènes à l'aide d'études *in vitro* et *in vivo* 110
4.3.1 Les systèmes *in vitro* pour les études du métabolisme chez le poisson 111
4.3.2 Les enzymes CYP450 de biotransformation chez le poisson 114
4.3.3 La truite arc-en-ciel comme modèle d'étude 115
Partie II : Objectifs de la thèse 117
Partie III : Résultats 121
Article 1 : Dye residues in aquaculture products: Targeted and mass spectrometric approaches to track their abuse 122
1.1 Contexte 122
1.2 Méthodologie et principaux résultats 122
1.3 Conclusion 124

Article 2 : In vitro investigations of the metabolism of Victoria pure blue bo dye to identify main metabolites for food control in fish 141

1.1 Contexte 141

1.2 Méthodologie et principaux résultats 141

1.3 Conclusion 143

Article 3 : Tissue distribution, metabolism, and elimination of the dye Victoria pure blue lead to an appropriate biomarker in trout 156

1.1 Contexte 156

1.2 Méthodologie et principaux résultats 156

1.3 Conclusion 158

Etude IV : Développement analytique issu des travaux menés sur le métabolisme: résultats préliminaires 171

1.1 Introduction 171

1.2 Matériel et Méthode 172

1.3 Résultats de développement 174

1.4 Conclusion et perspective analytique 183

Partie IV : Discussion générale et perspectives 185

Bibliographie 196

Annexes 210

Liste des abréviations

Certaines abréviations ont été volontairement gardées selon la terminologie anglo-saxonne si celle-ci est très usuelle.

ACN	Acétonitrile
ADN	Acide désoxyribonucléique
AhR	Aryl Hydrocarbon Receptor
ANOVA	Analyse de Variance
ANSES	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
AOAC	Association of Official Agricultural Chemists
APCI	Ionisation Chimique à Pression Atmosphérique
AZB	Azur B
BG	Brilliant Green (ou Vert Brillant)
BMD10	Benchmark Dose
CCα	Limite de Décision
CCβ	Capacité de Détection
CID	Collision Induced Dissociation
CV	Crystal Violet
CYP450	Cytochrome P450
DDQ	2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone
DGAL	Direction Générale de l'Alimentation
DJA	Dose Journalière Admissible
DL50	Dose Létale à 50 %
DLVPBO	Dééthyl-leuco-VPBO
DME	Drug Metabolizing Enzymes
ECHA	European Chemical Agency
EFSA	European Food Safety Agency
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EROD	Éthoxyresorutine-o-dééthylase
ESI	Ionisation par Electrospray ou Electronébulliseur
EV	Ethyl Violet
FAD/FADH	Flavine Adénine Dinucléotide
FAO	Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture
FDA	Food and Drug Administration
FWHM	Full Width Half Maximum
GC-MS	Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse
GSH	Gluthation
GST	Glutathion S-transférase
HAH	Hydroxylamine Hydrocloride
HAP	Hydrocarbure Aromatiques Polycycliques
HPLC-UV/VIS	HPLC à détection dans le domaine de l'ultraviolet ou du visible
(U)HPLC	Chromatographie Liquide (Ultra) Haute Pression
HRMS	Spectrométrie de Masse à Haute Résolution
IP	Points d'Identification

IT	Trappe d'Ion
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
LBG	Leucobase du Brilliant Green
LC	Chromatographie Liquide
LC-MS/MS	Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem
LCV	Leucobase du Crystal Violet
LMG	Leucobase du Malachite Green
LMR	Limite Maximale de Résidus
LOAEL	Lowest Observed Adverse Effect Level
LOD	Limite de Détection
LPMR	Limite de Performance Maximale Requise
LR-UE	Laboratoire de Référence de l'Union Européenne
MB	Methylene Blue
MeOH	Méthanol
MG	Malachite Green (ou Vert de Malachite)
MIP	Polymères à empreinte moléculaire
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	Spectrométrie de Masse
MSn	Fragmentation séquentielle d'ordre n
NAD/NADH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NBA	Nile Blue A
NMB	New Methylene Blue
NOAEL	No Observable Adverse Effect Level
NOEL	No Observed Effect Level
OMS (WHO)	Organisation Mondiale de la Santé
PCB	Polychlorobiphényles
PLS-DA	Régression des moindres carrés partielle par analyse discriminante
ppm	partie par million
PRRA	Pararosaniline
***p*-TSA**	p-Toluenesulfonic acid
QqQ	Analyseur triple Quadripolaire
QqLIT	Analyseur Quadripolaire couplé à une Trappe linéaire
QSAR	Relation quantitative structure-activité
QuEChERS	Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe
RASFF	Système d'alerte rapide pour les denrées alimentaires et les aliments pour animaux
RHB	Rhodamine B
RHG	Rhodamine 6G
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RPA	Reference Point for Action
S/N	Rapport signal/bruit
SPE	Extraction en Phase Solide
SULT	Sulfotransférases
TAMs	Triarylméthanes
TMPD	N,N,N′,N′-Tetramethyl-p-phenylenediamin
TOF	Temps de Vol
TR	Temps de Rétention

TSV	Toxicological Screening Value
UE	Union Européenne
UGT	UDP-Glucuronosyltransférases
VBB	Victoria Blue B
VBR	Victoria Blue R
VPBO	Victoria Pure Blue BO
VIP	Variable Importance in the Projection
VTR	Valeur Toxicologique de Réference

Liste des figures

Figure 1 : Production mondiale de pêches et d'aquaculture, Contribution relative des pêcheries d'aquaculture et de capture aux poissons pour la consommation humaine.. 20
Figure 2 : La pisciculture en France de 2010 à 2014. 22
Figure 3 : Trouble pathogène-hôte. Les interactions de l'environnement mènent à la maladie..... 23
Figure 4 : Structure des TAMs 28
Figure 5 : Structure des métabolites réduits (leuco-bases) des TAMs 29
Figure 6 : Structure des Victoria dérivés des TAMs 30
Figure 7 : Structure des Phénothiazines 30
Figure 8 : Structure des Rhodamines (RHG : à gauche, RHB : à droite)..... 31
Figure 9 : Structure du Nile blue A de la famille des Phénoxazines 31
Figure 10 : La « mycose du poisson » décime les truites de la Touvre..... 33
Figure 11 : Le cycle de vie d'Ichthyophthirius multifiliis. 33
Figure 12 : Traitement d'un bassin d'aquaculture au MG et enlèvement de poissons morts. 34
Figure 13 : Les différentes étapes du métabolisme des xénobiotiques. 38
Figure 14 : Concentrations moyennes dans le muscle de poisson-chat en MG et LMG. 41
Figure 15 : Voies métaboliques connues du MG (muscle, foie ; mammifères, poissons). 43
Figure 16 : Arbre décisionnel pour assigner des TSV pour les substances non autorisées à activité pharmacologique 51
Figure 17 : La réglementation européenne des colorants dans les produits d'aquaculture 56
Figure 18 : Représentation schématique du spectromètre de masse hybride LTQ-Orbitrap®..... 59
Figure 19 : Critères de performances à évaluer dans le cas de la validation d'une méthode de confirmation de résidus de substances interdites dans les denrées alimentaires. 78
Figure 20 : Représentation graphique du CCα et du CCβ pour les substances non autorisées. 83
Figure 21 : Nombre d'alertes recensées en Europe pour les colorants dans les produits d'aquaculture extraites du portail EU RASFF entre 2010 et 2019..... 89
Figure 22 : Etudes scientifiques de recherche de colorants dans les produits d'aquaculture 92
Figure 23 : Diagramme simplifié d'évaluation des risques pour une substance comme les colorants 94
Figure 24 : Représentation schématique des différentes sciences « omics ». 97
Figure 25 : Les trois principales applications de la métabolomique alimentaire, de la ferme à l'homme: la production de ressources alimentaires, la transformation industrielle des aliments et la consommation alimentaire par l'homme..... 99
Figure 26 : Le workflow de la métabolomique alimentaire. 103
Figure 27 : Paramètres utilisés pour décrire les performances d'un système de spectrométrie de masse.. 106
Figure 28 : Représentation du traitement de données d'une analyse métabolomique non ciblée. 109

Figure 29 : Schéma conceptuel de la conception d'un modèle *in vitro* chez le poisson pour évaluer la biotransformation de xénobiotiques, et les biomarqueurs couramment examiné..... 111
Figure 30 : Chromatogrammes obtenus pour AZB avec la colonne Ascentis Express C18 (Sigma) 175
Figure 31 : Chromatogrammes obtenus pour AZB avec la colonne Sunfire "Waters" 175
Figure 32 : Chromatogrammes obtenus pour AZB avec la colonne Accucore Phenyl Hexyl (Thermo) 176
Figure 33 : Dégradation de la colonne Accucore Phenyl Hexyl pour le colorant MB..... 177
Figure 34 : Comparaison de solvants d'extractions 178
Figure 35 : Rendements d'extraction QuEchERS..... 179
Figure 36 : Amélioration du protocole d'extraction (exemple pour MG + BG) 180
Figure 37 : Représentation des gammes d'étalonnage pour AZB..... 181
Figure 38 : Protocole d'extraction optimal des colorants et résidus marqueurs..... 182
Figure 39 : Etude d'occurrence restreinte pour applicabilité de la méthode développée..... 183
Figure 40 : Applicabilité de la méthode sur un échantillon positif en MG 183
Figure 41 : Workflow conventionnel utilisé lors des expérimentations de métabolomique environnementale. 189

Liste des tableaux

Tableau 1 : Production aquacole des principaux groupes d'espèces de poisson pour l'alimentation et par continent, en 2016 21
Tableau 2 : Effets antifongiques de colorants étudiés par le protocole 1 35
Tableau 3 : Concentrations maximales atteintes de résidus radioactifs dans différents fluides et tissus biologiques. 40
Tableau 4 : Toxicité *in vivo* de MG et LMG 47
Tableau 5 : Données de toxicité disponibles sur les TAMs et leurs dérivés permettant le calcul des TSV respectives 50
Tableau 6 : Questions évaluées afin d'établir une TSV pour une liste de colorants. 52
Tableau 7 : Méthodes d'analyses des colorants dans les produits d'aquaculture avec détection par spectrométrie de masse 67
Tableau 8 : Justesse minimale des méthodes quantitatives 82
Tableau 9 : Notifications recensées en Europe pour les colorants dans les produits d'aquaculture extraites du portail EU RASFF entre 2010 et 2019 90
Tableau 10 : Etudes métabolomiques réalisées en LC-HRMS dans le domaine de sécurité chimique des aliments d'origine animale. 100
Tableau 11: Récapitulatif des performances (résolution, exactitude en masse) des différents analyseurs de spectrométrie de masse. 106
Tableau 12 : Principaux modèles issus de cellules hépatiques de poisson 114
Tableau 13 : Colorants et marqueurs de traitement inclus dans le développement 173
Tableau 14 : Colonnes chromatographiques testées 173
Tableau 15 : Paramètres de gaz optimisés 174
Tableau 16 : Gradient pour les conditions finales avec la colonne Sunfire (Waters) 177
Tableau 17 : Comparaison d'intensité de pics suivant le solvant de reprise 179
Tableau 18 : Principaux résultats des études réalisées, avantages et inconvénients associés 187

Introduction

L'aquaculture a été l'industrie de production animale à la croissance la plus rapide au cours des quatre dernières décennies, et près de la moitié des poissons consommés dans le monde sont aujourd'hui des poissons d'élevage. La source de nourriture que représente les produits de la mer va très certainement continuer à augmenter parallèlement à la croissance démographique (FAO, 2018). Pour prévenir les maladies en aquaculture intensive, l'utilisation de produits chimiques thérapeutiques est devenue une nécessité plus qu'une alternative. Contrairement au grand arsenal thérapeutique disponible chez les mammifères pour lutter contre les maladies, le nombre de substances pharmaceutiques est limité en élevage aquacole, et concerne essentiellement certaines substances anesthésiques, des agents anti-infectieux et antimicrobiens, prescrits pour lutter contre les parasites et les maladies microbiennes très répandus dans les élevages aquacoles. Face à un arsenal thérapeutique limité et parfois inefficace pour lutter contre de multiples maladies, **les colorants**, et en particulier le vert de malachite, ont toujours constitué un recours malgré leur interdiction, du fait de leur large spectre d'efficacité. En effet, les colorants sont principalement utilisés comme traitement des infections fongiques et parasitaires externes chez les poissons et pour protéger les œufs en incubation contre les champignons.

Parmi ces colorants se trouve **la famille des triarylméthanes,** dont le très connu **vert de malachite.** Celui-ci a, par exemple, été utilisé à la fois à titre prophylactique dans le traitement des infections fongiques du poisson et des œufs pendant plus de 80 ans (Foster and Woodbury, 1936). A la fin des années 2000, l'OMS a recommandé son interdiction en traitement aquacole à cause de sa toxicité, constituant un risque avéré pour l'Homme et pour l'environnement (Verdon et al., 2015). Or, le vert de malachite et les triarylméthanes semblent toujours employés dans les élevages aquacoles de certains pays, exportant une partie de leur production vers l'Union Européenne (UE). Facilement disponibles sur le marché en tant que produits chimiques thérapeutiques, peu coûteux et efficaces pour les poissons d'ornement, leur usage en aquaculture reste d'actualité. De plus, des colorants autres que les triarylméthanes sont susceptibles d'être alternativement utilisés et donc retrouvés dans les produits d'aquaculture sous forme de résidus, c'est-à-dire à de faibles quantités détectables dans les aliments. Ces résidus peuvent provenir non seulement de traitements intentionnels non autorisés mais également de leur bioaccumulation dans l'environnement, notamment en aval d'industries utilisant ces colorants pour d'autres applications telles que la teinture du textile ou du papier (Schuetze et al., 2008). Dans un concept intégratif d'une seule santé, communément appelé « One Health », les

différentes voies d'exposition sont à prendre en compte afin de mieux connaitre les risques encourus par l'Homme sur le long terme et prendre les mesures de protection adéquates (Stenvinkel, 2020).

Ainsi, la présence de colorants thérapeutiques dans **les aliments issus de la production aquacole** s'est vue réglementée de par le monde depuis plus de 20 ans. **La réglementation européenne** impose par exemple aux pays membres de l'UE de surveiller les résidus de substances interdites dans les denrées d'origine animale afin d'assurer la sécurité des consommateurs. Parmi l'ensemble des colorants, trois sont particulièrement surveillés en Europe, le vert de malachite, le cristal violet et le vert brillant. Depuis très longtemps, il est bien établi que ces trois colorants triarylméthanes se métabolisent rapidement chez le poisson en leur analogue respectif réduit **sous forme de leucobase.** De nombreuses études de métabolisme et de pharmacocinétique ont convergé vers le choix de leurs leucobases comme étant de bons **résidus marqueurs de traitement et/ou d'exposition.** En France, le **contrôle officiel des colorants dans les denrées issues de l'aquaculture a été ciblé** sur la présence de ces trois résidus et de leurs leucobases, analysés par la chromatographie liquide couplée à une détection par spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS).

Le manque flagrant d'informations sur les colorants utilisés en aquaculture nécessite à la fois des investigations sur leur occurrence, et sur la connaissance des résidus marqueurs de traitement. Les résidus marqueurs doivent être persistants sur une période suffisamment longue pour être décelés par les systèmes de contrôle. Ils proviennent bien souvent du métabolisme du composé parent administré (métabolites exogènes), ou plus rarement d'un ensemble de modifications biochimiques endogènes spécifiques (métabolites endogènes). Parmi les molécules structurellement proches des triarylméthanes, on retrouve les molécules de **la famille des Victoria blue**, qui sont à l'heure actuelle peu connues et suspectées d'être utilisées en aquaculture. Ainsi, il nous a paru primordial de les étudier afin d'apporter des connaissances sur leur métabolisme et l'identification de leurs résidus marqueurs. Nous avons émis l'hypothèse que le **victoria pure blue** pourrait également se métaboliser chez le poisson, et induire des modifications métaboliques proches de celles du vert de malachite lors d'un traitement aquacole.

Pour répondre à ces préoccupations et afin d'anticiper une évolution de la réglementation et donc de leur surveillance, le Laboratoire de Référence de l'Union Européenne pour les résidus d'antibiotiques et de colorants (LR-UE, Anses-Fougères) a initié un projet de recherche sur les résidus de colorants qui est à l'origine de ce travail de thèse. D'une part, ces molécules et leurs

résidus marqueurs seront probablement dans le futur à intégrer à notre méthode nationale officielle de contrôle. Cette intégration serait opportune si l'Agence Européenne de Sécurité Alimentaire (EFSA) proposait une évolution réglementaire sur les colorants à usage interdit en aquaculture et recommandait un contrôle étendu à d'autres familles de colorants. D'autre part, sans attendre les recommandations, la mise en place d'une méthode de contrôle étendue à d'autres familles de colorants pourrait être utile dans le cas d'études d'expositions, non seulement alimentaires, mais également environnementales. Reposant sur l'analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse à Haute Résolution (LC-HRMS) du métabolome chez le poisson, les objectifs de ce travail de thèse étaient d'expérimenter différentes approches, non ciblée et semi-ciblée par des méthodologies *in vitro* et *in vivo* en vue de générer des données i) sur le comportement et le devenir des colorants chez les poissons d'élevage ii) sur leurs effets, en vue de proposer des marqueurs de traitement issus de l'endo-métabolome et/ou du xéno-métabolome.

Ce manuscrit présente les travaux réalisés selon quatre parties :

- La première fournit des éléments bibliographiques posant les fondements de ces travaux de thèse, sur la problématique de l'aquaculture intensive et de l'utilisation des colorants dans un contexte de contrôle réglementaire, et sur les outils de analytiques et de métabolomique explorés.
- La seconde partie, intermédiaire entre la synthèse bibliographique et les publications, précise la problématique de mon sujet de recherche,
- La troisième partie détaillera les différents travaux réalisés qui sont présentés sous forme de trois publications scientifiques et d'une quatrième étude sur le développement analytique qui se poursuit à l'heure actuelle.
- Une discussion finale apporte des éléments de réponse à la problématique, au regard des travaux effectués, et propose des perspectives de recherche en lien avec mon parcours scientifique passé et futur.

Partie I : Synthèse bibliographique

1 Les résidus de colorants dans les produits d'aquaculture

Ce chapitre présente la problématique d'un développement durable de l'aquaculture afin de répondre à la demande mondiale de consommation de poissons, en particulier ceux issus de l'aquaculture. Certaines maladies touchant cette filière en forte expansion, et les traitements médicamenteux sont parfois employés pour combattre celles-ci mais au détriment de la santé des consommateurs eux-mêmes. Par exemple, les résidus de substances interdites comme les colorants pouvant représenter un risque pour la santé humaine.

1.1 L'aquaculture en constante progression

1.1.1 Le poisson, une source essentielle de nourriture pour l'Homme

Les produits de la mer font partie du régime alimentaire des hommes dans leur Histoire. On retrouve des traces de consommation de poissons et coquillages depuis bien avant l'antiquité (Barrett, 2019). L'attrait et la consommation de poissons sont d'ailleurs intégrés jusqu'à aujourd'hui aux traditions culturelles de nombreux peuples. Dans certaines populations, le poisson est la principale source de nourriture et de nutriments essentiels. Il leur fournit de l'énergie, des protéines et toute une gamme d'autres éléments nutritifs importants, notamment les acides gras polyinsaturés à longue chaîne. Parmi la population adulte en général, la consommation de poisson, en particulier de poisson gras, réduit le risque de mortalité par maladie coronarienne. Aujourd'hui, la croissance démographique mondiale représente un enjeu majeur pour répondre à la demande nutritive de la planète. Aussi, les produits d'aquaculture, ainsi que les micro-algues, les insectes, les protéines monocellulaires et les co-produits, représentent un potentiel énorme d'apport nutritif dans l'exploration des protéines alternatives (Kim et al., 2019).

L'utilisation la plus courante des ressources halieutiques, c'est-à-dire les ressources vivantes aquatiques, est sous forme alimentaire. Plus de 75 % de la production mondiale de poisson est destinée à la consommation humaine directe, et la consommation de poisson frais croît aux dépens d'autres formes de produits à base de poisson (poisson en conserve, par exemple). Le

poisson débarqué non destiné à la consommation humaine directe est réduit en farine de poisson et en huile, principalement pour les porcs et les poulets et, plus récemment, pour l'élevage d'espèces aquatiques carnivores (telles que le saumon, la crevette, le bar, la dorade, etc.).

1.1.2 L'Asie, principal producteur de produits d'aquaculture

Nous comprenons donc pourquoi, dans ce contexte de besoin de ces ressources, l'aquaculture a un rôle majeur à jouer pour l'avenir. Mais tout d'abord redéfinissons le terme « aquaculture », afin de mieux appréhender ce challenge. L'aquaculture consiste dans la culture d'organismes aquatiques, y compris poissons, mollusques, crustacés et plantes aquatiques. Le terme « culture » implique une quelconque forme d'intervention dans le processus d'élevage en vue d'améliorer la production, telle que l'empoissonnement à intervalle régulier, l'alimentation, la protection contre les prédateurs, etc. Plus précisément, cet élevage d'organismes aquatiques se situe dans les zones côtières et intérieures appelant une intervention dans le processus d'élevage en vue d'en améliorer la production. Selon la FAO, c'est probablement la filière de production alimentaire qui connaît la croissance la plus rapide, et elle produit actuellement 50 % des poissons destinés à la consommation humaine dans le monde (**Figure 1**).

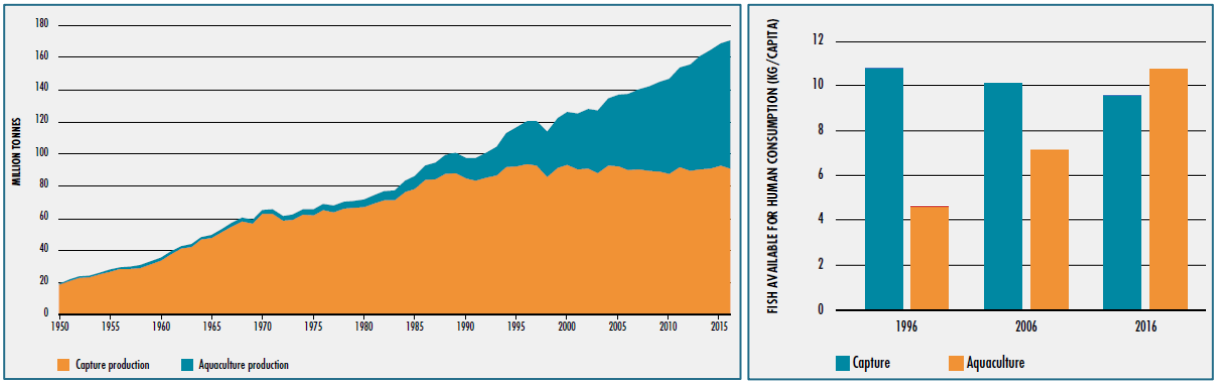


Figure 1 : Production mondiale de pêches et d'aquaculture (graphique de gauche), Contribution relative des pêcheries d'aquaculture et de capture aux poissons pour la consommation humaine (graphique de droite). Source : (FAO, 2018).

En effet, l'aquaculture continue de croître plus vite que les autres principaux secteurs de la production alimentaire, même si elle ne bénéficie plus des taux de croissance annuels élevés des années 1980 et 1990 (11,3 % et 10 %, plantes aquatiques exclues). La croissance annuelle moyenne est tombée à 5,8 % sur la période 2000-2016, même si une croissance à deux chiffres a encore été observée dans un petit nombre de pays, en particulier en Afrique entre 2006 et 2010. L'ensemble de la production mondiale aquacole s'élevait à 80 millions de tonnes de poisson, dont 54 millions de tonnes de poisson, 17 millions de tonnes de mollusques,

8 millions de tonnes de crustacés et 1 million de tonnes d'autres animaux aquatiques. La Chine est de loin le principal producteur de poisson d'élevage, et produit plus que le reste du monde chaque année depuis 1991. Les autres principaux producteurs en 2016 étaient l'Inde, l'Indonésie, le Viet Nam, le Bangladesh, l'Égypte et la Norvège. Les pays asiatiques contribuent donc à la quasi-totalité de cette production, soit 89 % de la production sur les deux dernières décades, comme le montrent les chiffres du **Tableau 1** (FAO, 2018). Parmi les espèces halieutiques d'élevage, le poisson constitue la catégorie principale, très loin devant celle des crustacés et des mollusques. Les espèces d'élevage les plus produites sont les carpes, et le Tilapia, représentant environ la moitié du poisson d'élevage.

Tableau 1: Production aquacole des principaux groupes d'espèces de poisson pour l'alimentation et par continent, en 2016 (en milliers de tonnes, équivalent-poids vif). Source: traduit de (FAO, 2018).

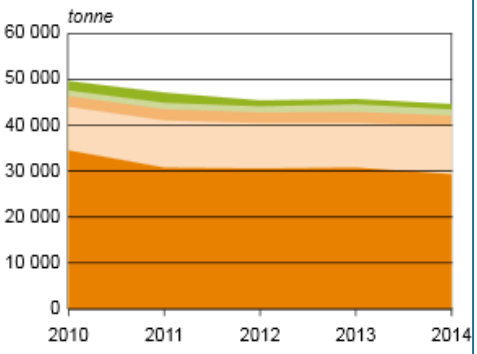
Catégorie	**Afrique**	**Amérique**	**Asie**	**Europe**	**Océanie**	**Monde**
Aquaculture en eaux intérieures						
Poissons	1 954	1 072	43 983	502	5	47516
Crustacés	0	68	2 965	0	0	3033
Mollusques			286			286
Autres espèces aquatiques		1	531			531
Sous-total	**1 954**	**1 140**	**47 765**	**502**	**5**	**51 367**
Aquaculture marine et côtière						
Poissons	17	906	3 739	1 830	82	6 575
Crustacés	5	727	4 091	0	6	4 829
Mollusques	6	574	15 550	613	112	16 853
Autres espèces aquatiques	0		402	0	5	407
Sous-total	**28**	**2207**	**23 781**	**2 443**	**205**	**28 664**
Aquaculture tout type confondu						
Poissons	1 972	1 978	47 722	2 332	87	54 091
Crustacés	5	795	7 055	0	7	7 862
Mollusques	6	574	15 835	613	112	17 139
Autres espèces aquatiques	0	1	933	0	5	939
TOTAL	**1 982**	**3 348**	**71 546**	**2 945**	**210**	**80 031**

1.1.3 La France, troisième producteur en Europe

En Europe, l'aquaculture en 2010 représentait une production d'environ 2 520 000 tonnes pour seulement 4 % de la production aquatique animale mondiale). La France avec 224 000 tonnes se trouve en 4ème position, très loin derrière la Norvège (1er producteur mondial de saumon) et juste au niveau de l'Espagne et du Royaume-Uni (2nd et 3^{e} producteurs européens).

Production de la pisciculture

	2010	2013	2014	2014
		tonne		*million d'euros*
Pisciculture continentale(1)	44 005	40 513	39 850	127
Salmonidés	35 803	32 178	31 448	111
dont truite arc-en-ciel	*34 546*	*30 818*	*29 347*	*98*
Poissons d'étang	8 000	8 000	8 000	13
Autres	202	335	402	3,0
Pisciculture marine(2)	5 668	5 215	4 804	37
dont bar	*2 337*	*2 428*	*2 244*	*17*
dorade royale	*1 239*	*1 636*	*1 379*	*10*
Total pisciculture	49 673	45 728	44 654	164



Si la production norvégienne continue régulièrement de progresser, celle de la France stagne (Ifremer, Source FAO 2012, données 2010). Ainsi, la valeur des importations en France de produits aquatiques augmente de 7 % en un an. Parmi ceux-ci, les achats de poissons frais ou congelés (entiers et filetés) croissent de 13 % tandis que les préparations et conserves de poissons diminuent de 5 %. La part consommée de poisson d'élevage par les Français représente seulement 11 % du poisson consommé (FranceAgriMer, 2018). En France, la production de produits aquatiques ne couvre que partiellement la consommation. Parmi les principales espèces dont la balance est excédentaire, deux viennent pour partie ou totalement de l'élevage : la truite et les huîtres. La truite arc-en-ciel (**Figure 2**) est l'espèce far de l'élevage en France, très appréciée des pêcheurs pour le loisir et la consommation.

Figure 2 : La pisciculture en France de 2010 à 2014. Source: http://agreste.agriculture.gouv.fr

Des données plus récentes indiquent que la France, en tant que troisième producteur européen de truites élevées en eau douce, a produit près de 33 000 tonnes en 2018, démontrant une tendance à la hausse de la production (Agreste, 2018).

1.2 Des maladies aquacoles aux résidus de médicaments

Avec plus d'un tiers de la production mondiale de poisson commercialisée à l'échelle internationale, l'assurance de la qualité et de l'alimentation est devenue un problème majeur. L'activité aquacole a connu un essor fulgurant au cours des trois dernières décennies, imposant de faire face à des challenges importants, en particulier dans le contrôle des pathogènes responsables des maladies infectieuses qui limitent actuellement la poursuite de l'intensification.

1.2.1 La production intensive aquacole : source de stress

Le processus d'intensification de l'élevage animal tel que celui opéré pour les animaux de rente et pour les volailles au cours du XXème siècle, a fait face aux problèmes inhérents à cette approche productiviste (génétique, reproduction, nutrition, santé animale..). Aujourd'hui l'aquaculture doit à son tour s'adapter. Les maladies les plus courantes affectant l'aquaculture sont causées par une multitude d'agents pathogènes bactériens, fongiques ou viraux. Ces maladies sont particulièrement courantes chez les poissons soumis à un stress chronique. Les principales causes de stress peuvent être directement liées à des pratiques de manipulation inadéquates, à une eau et à des aliments de mauvaise qualité qui ne répondent pas aux besoins nutritionnels des différentes espèces de poissons. Ainsi, une alimentation de mauvaise qualité augmente les risques d'apparition de maladies associée à un taux de mortalité élevé. La densification des bancs de poissons au cours de l'élevage est un autre facteur de stress important en aquaculture (Rosa et al., 2020). Le degré de stress résultant de ces conditions conduit à des modifications des mécanismes biochimiques, physiologiques et comportementaux, amenant presque inéluctablement au déclenchement de maladies (**Figure 3**) (Pérez-Sánchez et al., 2018).

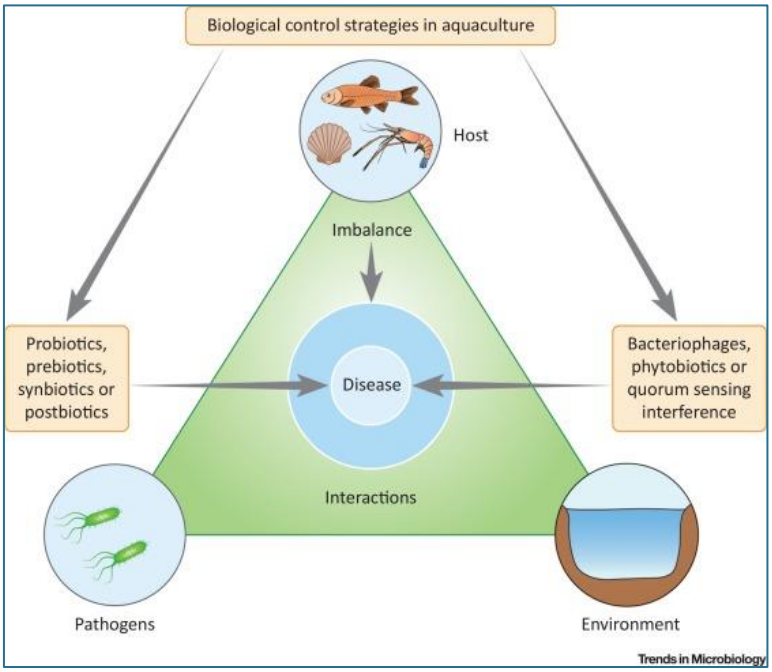


Figure 3 : Trouble pathogène-hôte. Les interactions de l'environnement mènent à la maladie. Source : (Pérez-Sánchez et al., 2018).

1.2.2 L'aquaculture affectée par une multitude de maladies

En aquaculture, jusqu'à 50 % des pertes de production sont causées par les maladies (Assefa and Abunna, 2018). Celles-ci proviennent essentiellement des infections bactériennes, notamment par les bactéries à gram négatif, constituant la source la plus importante de maladie dans les différents types de production. Les maladies fongiques constituent la deuxième source de pertes, en particulier dans l'élevage de crustacés et de salmonidés. Les parasites protozoaires externes sont également responsables de la perte d'un grand nombre de poissons et d'alevins et sont une cause d'épizooties chez les jeunes crustacés (Meyer, 1991). Comme nous l'avons vu précédemment, ce sont les facteurs de stress qui augmentent la susceptibilité aux processus infectieux causés par des agents pathogènes opportunistes tels que virus, bactéries, champignons et parasites (Lunestad and Samuelsen, 2008):

- Les **virus** peuvent incommoder les élevages aquacoles, mais ne font pas l'objet de traitement thérapeutique.
- De nombreuses espèces **bactériennes**, plus d'une centaine, ont été recensées comme facteurs de maladies dans les pisciculture d'eau douce et marines telles que les Aeromonas, les Streptocoques, les Flavobactéries, les Vibrio, … etc.
- Certains champignons microscopiques peuvent affecter les élevages, telles que la saprolegniose (*Saprolegnia sp.)*. Ces champignons représentent principalement un problème dans les élevages en eau douce et peuvent nécessiter un traitement antifongique des œufs de poisson ou des alevins.
- Les poissons sont les hôtes d'une multitudes **d'ectoparasites et d'endoparasites**. Ces parasites sont spécifiques de certains écosystèmes et ont généralement des effets limités sur la santé des poissons. Cependant, les parasites peuvent être un facteur aggravant dans des conditions stressantes et augmenter la morbidité. Par exemple, les poissons-chats exposés à un stress hydrique de 30 minutes avec un manque d'eau entraînaient environ 20 % de mortalité quand ils étaient exposés à *Edwardsiella ictaluri* par rapport aux poissons témoins (Bilodeau et al., 2005). Au Brésil, les parasites sont les agents pathogènes les plus étudiés dans la pisciculture brésilienne (Hashimoto et al., 2011). Ils affectent les deux espèces les plus représentées au Brésil, la carpe commune et le tilapia. Les poissons peuvent alors perdre du sang par les branchies et subir des nécroses qui entraînent une réduction du rythme respiratoire et une altération de la capacité de régulation.

1.2.3 Les traitements peuvent conduire à des résidus dans les aliments

Les conditions de stress telles que la forte densité piscicole, l'hypoxie (demande biochimique en oxygène non maîtrisée) ou les concentrations élevées en nitrites et en ammoniac contribuent à l'apparition de maladies et peuvent amener à des traitements médicamenteux.

↳ Les substances pharmacologiques utilisées

Les traitements thérapeutiques et prophylactiques en aquaculture incluent principalement les antibiotiques, les antiparasitaires, les anesthésiques et les désinfectants (Burridge et al., 2010). Les antibiotiques autorisés pour un usage en aquaculture au sein de l'Union Européenne sont listés dans le règlement CE 37/2010 (Commission Européenne, 2010) et incluent les tétracyclines, les pénicillines, les quinolones, les sulfamides et le triméthoprime (Oliveri Conti et al., 2015; Justino et al., 2016). Les antiparasitaires administrés, contre le pou du saumon par exemple, sont classés en deux groupes en fonction de leur voie d'administration, les traitements par balnéation et les additifs alimentaires. Les pyréthroïdes, le peroxyde d'hydrogène et les organophosphorés sont ou ont été administrés par des techniques de bain, tandis que les avermectines sont administrées comme additifs dans les aliments pour pisciculture.

Parmi ces produits thérapeutiques, un état des lieux de l'utilisation des antibiotiques publié en 2017, signale que 67 antibiotiques ont été utilisés dans 11 des 15 grands pays producteurs aquacoles mondiaux entre 2008 and 2018. Parmi ces pays, dont le Vietnam, la Chine et le Bengladesh, 73 % ont traité avec l'oxytetracycline, la sulphadiazine et le florfenicol (Lulijwa et al., 2019). Parmi ces 67 antibiotiques, 14 ont été détecté à des niveaux excédant les limites réglementaires, parmi lesquels les sulfamides étaient en tête de liste avec 43 % des composés reportés, suivis par les quinolones reportées à 36 %.

Certains antimicrobiens tels que le chloramphénicol, le vert de malachite (MG) et les nitrofuranes (par exemple, la furazolidone, la furaltadone, la nitrofurazone et la nitrofurantoïne) ont été interdits dans les pratiques d'aquaculture pour des raisons de sécurité des aliments. La réglementation sur MG et certains autres colorants à activité thérapeutique sera d'ailleurs abordée dans le paragraphe 2.1.

↳ La présence de résidus dans les produits d'aquaculture

Ainsi, les dérèglements liés aux conditions intensives d'élevage conduisent presque inévitablement aux maladies, bien souvent traitées au détriment d'une meilleure zootechnie par l'emploi d'un arsenal de produits chimiques à visée thérapeutique ou prophylactique. Les contaminants chimiques présents dans les élevages, intentionnellement ou non, peuvent être métabolisés puis excrétés par l'animal. Ils sont alors potentiellement détectables à **des niveaux résiduels** dans l'environnement aquacole ou accumulés dans le poisson. Les résidus qui resteraient présents dans la chair de poisson, peuvent poser des problèmes pour le consommateur de cette denrée alimentaire si les limites réglementaires établies pour le résidu de la substance chimique en question ne sont pas respectées.

La bioaccumulation de résidus de contaminants représente non seulement un risque potentiel pour la santé publique mais aussi pour l'équilibre et la santé de l'environnement. En effet, cette bioaccumulation peut devenir toxique dans les élevages et aux alentours pour les poissons, les bivalves, les crustacés et les mollusques, ainsi que pour certaines plantes. De plus, les contaminations peuvent être liées, non seulement aux traitements intentionnels, mais aussi à l'usage d'aliments commerciaux pour animaux dont les ingrédients peuvent contenir des résidus de médicaments vétérinaires, des polluants organiques persistants, des pesticides, ou encore des métaux (mercure, plomb, cadmium, chrome hexavalant, arsenic et sélénium). Les teneurs en résidus médicamenteux et en contaminants de l'environnement sont strictement contrôlées par les réglementations mondiales et européennes afin de définir les concentrations maximales acceptables de ces substances dans les produits alimentaires (poissons, coquillages, crustacés), provenant de l'aquaculture ou de la pêche (Justino et al., 2016).

1.3 Les résidus de colorants

Les colorants sont présents depuis la nuit des temps dans la vie de l'Homme. Ils ont d'abord servi comme moyen de communication, d'identification et d'expression, par les peintures rupestres et le maquillage. Puis la couleur a pris place progressivement pour teindre les vêtements, les voitures, les jouets ; pour colorer les bonbons, les fleurs, puis finalement les aliments de tous les jours. Ils sont devenus omniprésents dans l'industrie chimique tels que la cosmétique, le textile, et dans l'agroalimentaire. Pendant la première moitié du XXème siècle, certains colorants ont été découverts comme ayant des propriétés thérapeutiques.

1.3.1 Présentation des principales familles de colorants

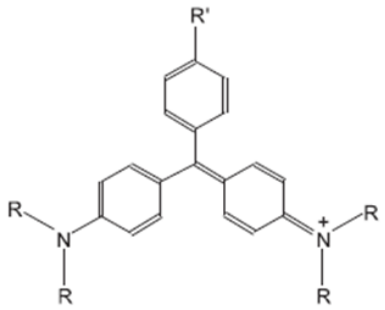
Parmi les colorants possédant une activité pharmacologique, les plus fréquemment utilisés en aquaculture appartiennent à la famille des triarylméthanes (TAMs), aux propriétés antifongiques, antiparasitaires, ou antimicrobiennes. Il existe d'autres familles dont certaines propriétés thérapeutiques sont communes aux TAMs tels que les xanthènes, les phénothiazines et les phénoxazines. De plus, il existe des produits dérivés des TAMs, tels que les colorants de la famille des victoria. En dehors de leurs propriétés antimicrobiennes, certains colorants peuvent présenter d'autres avantages. C'est le cas des dérivés phénylazoïques qui permettent l'intensification de la couleur naturelle de certains produits alimentaires (chair des poissons, œufs …).

La plupart des colorants abordés dans cette thèse font partie du rapport scientifique publié par l'EFSA faisant l'objet d'une évaluation toxicologique afin d'anticiper un renforcement du dispositif de surveillance actuel si il s'avère nécessaire (EFSA et al., 2017a). Beaucoup de ces colorants sont encore méconnus tout du moins en ce qui concerne leur utilisation en aquaculture. Ils ont été évalués par l'EFSA quant-à leur toxicité afin d'en mesurer le risque pour la santé humaine en cas d'usage vétérinaire frauduleux ou d'occurrence dans l'alimentation (via l'environnement par exemple). Ils peuvent se répartir en plusieurs familles de composés :

Les triarylmethanes (TAMs) : Les TAMs sont parmi les plus anciens colorants fabriqués industriellement. Ils étaient initialement préparés par des méthodes découvertes empiriquement. La synthèse du MG a été obtenue en 1877 par O. Fisher à partir du benzaldéhyde et de la diméthylaniline par des procédés encore utilisés industriellement aujourd'hui (Gessner and Mayer, 2000). Leur force de coloration et de brillance leur confèrent en première intention des applications industrielles variées : teintures du papier, de fibres de coco et de jutes, et autres fibres à base de lignine ; fabrication des encres, coloration de détergents et de fertilisants, teintures de cuirs... ; ils peuvent être utilisés également comme agents de protection contre la transmission de certaines maladies humaines par transfusion (Duxbury, 1993). Le cristal violet (CV) aussi appelé violet de gentiane, et l'éthyl violet (EV), ont été aussi utilisés pour marquer la viande d'empreintes indélébiles (Reyns et al., 2014). Ils portent ainsi différents noms liés à leurs propriétés, comme le victoria pure blue bo également appelé basic blue 7 ou pigment blue 1 (Gessner and Mayer, 2000). Leur deuxième application est liée à l'industrie aquacole du fait de leurs puissantes propriétés antiseptiques et antiparasitaires (Foster and Woodbury, 1936).

Les TAMs se trouvent généralement sous leur forme cationique (TAM^+), car de nature très électrophile. Ce sont des hydrocarbures composés de trois cycles phényles reliés entre eux par un triple pont carbone. La présence de groupements chromophores et d'une forte délocalisation électronique fait de ces molécules des colorants vifs contrairement à leurs formes réduites incolores (**leuco-bases**). Ces molécules sont solubles dans les solvants organiques tels que le méthanol (MeOH) ou l'acétonitrile (ACN). Les molécules de la famille des TAMs varient par la substitution des groupements en position para des cycles benzéniques (

Figure 4). Les molécules de cette famille, étudiées lors de cette étude en particulier pour le développement de méthodes analytiques, sont le Vert de Malachite (MG), le Vert Brillant (BG), le Cristal Violet (CV) ainsi que la Pararosaniline (PRRA) et l'Ethyl violet (EV).



Molécule	R=	R'=	Formule brute	Masse molaire g/mol	Log P
MG	Me	H	$C_{23}H_{25}ClN_2$	364.9	0.62
BG	Et	H	$C_{27}H_{34}N_2O_4S$	482.6	3.13
CV	Me	NMe_2	$C_{25}H_{30}ClN_3$	408.0	0.98
EV	Et	NEt_2	$C_{31}H_{42}ClN_3$	492.1	4.7
PRRA	H	NH_2	$C_{19}H_{18}ClN_3$	323.8	-0.21

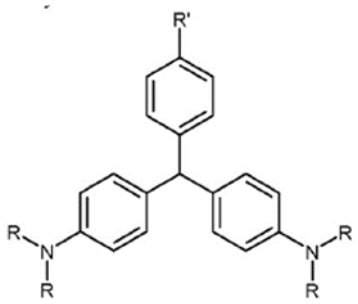
Figure 4 : Structure des TAMs

↳ Propriétés physico-chimiques du MG : Ce colorant cationique est constitué de cristaux verts à éclat métallique. Sa formule brute et son poids moléculaire sont donnés

Figure 4. MG est disponible sous différentes formes, principalement sous la forme d'oxalate ou de chlorhydrate, ou dissous dans une solution nominale à 50 % sous la forme d'un mélange de sel acétique et de chlorhydrate (Alderman, 1985). Sa couleur verte est indépendante de sa combinaison anionique avec le chlore ou l'oxalate. En plus des variations résultant de sels différents, les TAMs tels que MG peuvent exister sous deux formes ioniques: le sel colorant et le carbinol ou pseudobase (également appelée base colorante ou base carbinol). La plupart des réactions à l'équilibre ionique sont effectivement instantanées, mais les TAMs appartiennent à une gamme limitée de cations qui se combinent lentement avec des ions hydroxyles de manière covalente pour produire une pseudobase non ionisée. (Albert, 1958) souligne que les pseudobases de tels colorants ont une liposolubilité bien supérieure à celle du cation et indique que c'est probablement en tant que pseudobase que ces ions pénètrent dans les cellules. Selon

Goldacre et Phillips (Goldacre and Phillips, 1949), la constante d'ionisation du MG donne un pKa de 6,90. À pH 4, MG est ionisé à 100 %, à 50 % à pH 6,9, à 25 % à pH 7,4 et à 0 % à pH 10,1.

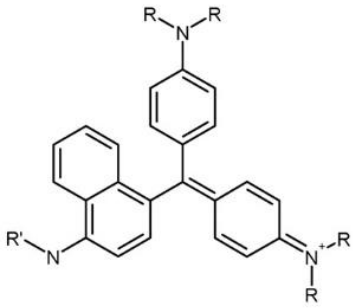
Métabolites des TAMs : Un métabolite est défini comme étant un résidu stable après transformation biochimique de la molécule mère principalement par le métabolisme. Le foie joue un rôle prépondérant dans le métabolisme animal. Si le métabolite est plus persistant dans l'organisme que la molécule mère, comme dans les tissus du poisson par exemple, il peut alors être considéré comme un résidu marqueur d'intérêt pour prouver un usage préalable du colorant. Les principales bio-transformations des TAMs sont de nature oxydo-réductives. Le métabolisme sera détaillé dans le sous-chapitre ci-après. Les principaux métabolites suivis comme résidus marqueurs d'un traitement par les TAMs ont été identifiés comme étant **leurs formes réduites encore appelées leuco-bases**. Les leuco-bases étudiées lors de notre projet (**Figure 5**) sont le Leuco Vert de Malachite (LMG), le Leuco Cristal Violet (LCV) et le Leuco Vert Brillant (LBG).



Molécule	R=	R'=	Formule brute	Masse molaire g/mol	Log P
LMG	Me	H	$C_{23}H_{26}N_2$	330.5	5.7
LBG	Et	H	$C_{27}H_{34}N_2$	386.5	/
LCV	Me	NMe_2	$C_{25}H_{31}N_3$	373.5	/

Figure 5 : Structure des métabolites réduits (leuco-bases) des TAMs

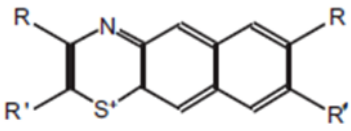
Les dérivés des TAMs: Les dérivés des TAMs (**Figure 6**) sont des hydrocarbures composés de 2 ou 3 cycles phényle et d'un cycle naphtyle issu de la substitution d'un phényle, donc de structure **triarylnaphtylméthane**. De par leurs propriétés proches de celles des TAMs, ils sont également utilisés dans l'industrie chimique pour colorer le papier, et dans le domaine de l'impression. Ils ont été décrit depuis très longtemps par Orland and McClure comme étant de très bons indicateurs colorés des réactions acido-basiques, de même que d'autres dérivés comme la Pararosaniline et la Rhodamine B (Orland and McClure, 1959). Les molécules étudiées lors de cette étude, en particulier pour le développement de méthodes analytiques, sont le Victoria Blue B (VBR), le Victoria Blue R (VBR) et le Victoria Pure Blue BO (VPBO), étudié également pour son métabolisme chez le poisson.



Molécule	R=	R'=	Formule brute	Masse molaire g/mol	Log P
VBB	Me	Ph	$C_{33}H_{32}ClN_3$	506.1	3.3
VBR	Me	Et	$C_{29}H_{32}ClN_3$	458.0	2.1
VPBO	Et	Et	$C_{33}H_{40}ClN_3$	514.1	4.1

Figure 6 : Structure des Victoria dérivés des TAMs

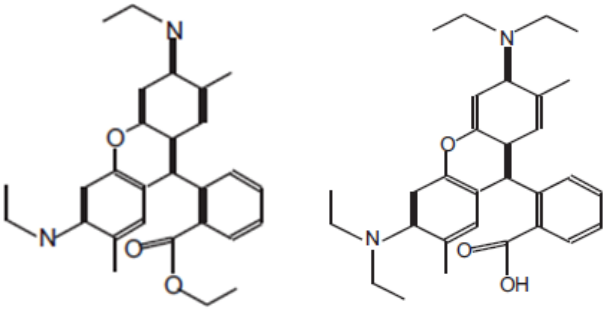
Les phénothiazines : Les phénothiazines (**Figure 7**) sont composés d'un cycle thiazine, comprenant un soufre et un azote, et de deux cycles benzéniques. Cette famille comprend le Methylene Blue (MB), son métabolite principal l'Azur B (AZB) et le New Methylene Blue (NMB). MB et AZB ne diffèrent que par la substitution d'un méthyle par un hydrogène sur un azote tertiaire. Il a été démontré que le MB peut conduire à l'obtention de l'AZB après avoir subi une dé-méthylation (Gessner and Mayer, 2000). MB manifeste des propriétés antiseptiques, et peut être utilisé pour traiter les infections parasitaires et fongiques. Il avait été synthétisé dès 1876 comme colorant dérivé de l'aniline pour l'industrie textile, puis des équipes scientifiques ont rapidement découvert son potentiel pour la coloration en microscopie. MB a été le premier composé de ce type à être administré à l'homme car il s'est avéré efficace dans le traitement du paludisme (Oz et al., 2011). Il a de ce fait été le premier colorant reconnu pour son applicabilité thérapeutique.



Molécule	R=	R'=	R''=	Formule brute	Masse molaire g/mol	Log P
MB	H	NMe_2	NMe_2	$C_{16}H_{18}ClN_3S$	319.9	0.75
AZB	H	NMe_2	NHMe	$C_{15}H_{16}ClN_3S$	305.8	3.5
NMB	Me	NHEt	NHEt	$C_{18}H_{22}ClN_3S$	347.9	/

Figure 7 : Structure des Phénothiazines

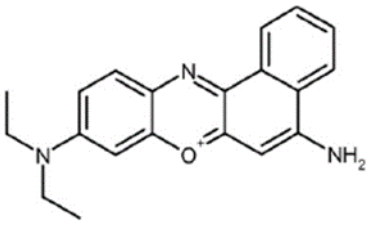
Rhodamines : Les rhodamines font partie d'une famille de composés chimiques, les xanthènes, constitués de deux cycles benzéniques rattachés par un cycle pyrane. La FAO et la littérature scientifique ont associé les colorants xanthéniques à la question de la coloration illégale du saumon et de la pâte de poisson et à ses éventuelles conséquences toxicologiques (Reyns et al., 2014). Les rhodamines ont des propriétés antimicrobiennes similaires aux TAMs et sont fluorescents. Nous avons étudié ici la Rhodamine 6G (RHG) et la Rhodamine B (RHB) (**Figure 8**).



Molécule	Formule brute	Masse molaire g/mol	Log P
RH6G	$C_{28}H_{31}ClN_2O_3$	479.0	6.36
RHB	$C_{28}H_{31}ClN_2O_3$	479.0	1.95

Figure 8 : Structure des Rhodamines (RH6G : à gauche, RHB : à droite)

Phénoxazines : Leur structure consiste en une oxazine fusionnée à deux cycles benzéniques. Ils sont peu résistants à la lumière, sont utilisés dans l'industrie du textile, notamment pour teindre les fibres acryliques. Le Nile blue A (NBA) (**Figure 9**) est utilisé pour la coloration en histologie. Les dérivés du Nile blue A ont été associés comme photosensibilisants potentiels dans la thérapie photodynamique des tumeurs malignes (Lin et al., 1991).



Molécule	Formule brute	Masse molaire g/mol	Log P
NBA	$C_{20}H_{20}ClN_3O$	353.8	3.3

Figure 9 : Structure du Nile blue A de la famille des Phénoxazines

1.3.2 Efficacité et usages des TAMs en aquaculture

Outre leur application principale dans l'industrie chimique pour leurs propriétés colorantes, les TAMs, et essentiellement MG, ont été utilisés mondialement en aquaculture pour le traitement des infections parasitaires et fongiques chez le poisson et les crustacés. L'efficacité du MG en pisciculture a d'abord été reportée en 1933 par Foster et Woodbury (Foster and Woodbury, 1936). Leur mode d'action a été reconnu très tôt, et particulièrement leur puissante action antimicrobienne (Churchman and Herz, 1913). Leur activité est maximale contre les bactéries à Gram positif, mais plus réduite contre les bactéries à Gram négatif, les bactéries acido-résistantes et les spores bactériennes.

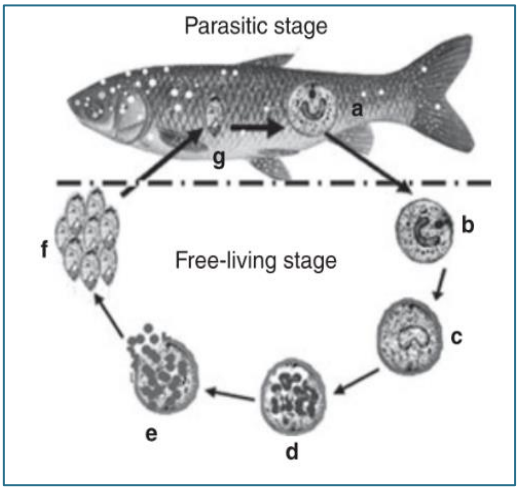
Des études *in vivo* sur le rat ont révélé que la puissante activité antimicrobienne du MG provenait de son interaction sur les systèmes NAD/NADH et FAD/FADH, et agissait donc comme un poison des enzymes de la chaine respiratoire mitochondriale (Werth and Boiteux, 1968). Aussi la popularité du MG est liée à son large spectre d'action antimicrobienne comme énoncé précédemment, et à son efficacité dans la prévention et le traitement de certains types de maladies du poisson, comparés aux autres substances chimiques à disposition (Alderman, 1985; Halme et al., 2007).

↳Utilisation comme antifongique

Les colorants de structure arylméthane ont un large spectre d'activités antifongiques (Alderman, 1982), et d'ailleurs MG s'est avéré être le fongicide le plus efficace parmi 49 composés testés contre un champignon oomycète (Campbell et al., 2001). Il prévient efficacement la prolifération de ce champignon sur les poissons et leurs œufs, à la fois comme thérapie post-infection et en prophylaxie. Ces oomycètes, des eucaryotes filamenteux, sont responsables de la maladie « saprolégniose » (*Saprolegnia spp.*) chez les poissons d'eau douce et leurs œufs (**Figure 10**) et peuvent provoquer d'autres infections fongiques chez les crustacés marins. La saprolégnose a également été efficacement contrôlée par MG chez le saumon, le poisson-chat et la truite arc-en-ciel (Srivastava et al., 2004). Les effets du formol, du MG et de divers mélanges des deux substances, ainsi que ceux de différentes durées de balnéation sur la croissance et la survie des souches de ces champignons ont été étudiés en détail par Olah et Farkas (Oláh and Farkas, 1978).

Figure 10 : La « mycose du poisson » décime les truites de la Touvre. Source : Par charentelibre.fr, publié le 26 mars 2018

↳Utilisation comme antiparasitaire



Dans les années 1950, MG a d'abord été utilisé comme antiseptique contre les parasites internes et externes (Wu et al., 2007). Puis dans les années 1960, MG s'est avéré le traitement le plus efficace contre les ectoparasites à protozoaires, en particulier *Ichthyophthirius multifiliis*, engendrant la maladie des points blancs ou White spot disease. La maladie des points blancs survient aussi bien chez les poissons sauvages que chez les poissons d'élevage (**Figure 11**). Elle a d'importantes conséquences économiques.

Figure 11 : Le cycle de vie d'Ichthyophthirius multifiliis. Les différents stades du parasite jusqu'à l'envahissement de l'épithélium de son hôte. Sous la ligne pointillée se trouve le stade de la vie libre, au-dessus le stade parasite. Source: (Wei et al., 2013)

En effet, sans traitement préventif, elle peut entraîner une mortalité élevée chez les poissons juvéniles et adultes, comme par exemple au Pérou avec la perte de 18 millions de poissons en 1988 dans le Lac Titicaca (Wurtsbaugh and Tapia, 1988). La maladie des points blancs avait été signalée pour la première fois dans une ferme piscicole finlandaise au milieu des années 1970, tuant plus de 80,000 saumons en 1978 (Rintamäki-Kinnunen et al., 2005).

MG est également efficace sur une autre maladie appelée maladie rénale proliférative des salmonidés, et causée par un parasite myxozoaire de la famille des cnidaires (Clifton-Hadley and Alderman, 1987; Hedrick et al., 1993).

↳ MG surtout administré par balnéation

La plupart du temps, les traitements sont réalisés par balnéation dans des cuves ou bassins avec des durées curatives plus ou moins longues (de quelques heures à quelques jours) et des doses variables de l'ordre du ppm (Alderman, 1985). La **Figure 12** représente un traitement d'un bassin d'aquaculture au MG. En République tchèque, MG a été le plus souvent utilisé pour traiter les cas impliquant certains parasites (*Ichthyobodo necator, Trichodina sp., Trichodinella sp., Chilodonella sp. et Ichthyophthirius multifiliis*), et les cas d'infections fongiques cutanées du poisson et des œufs de poisson. Un bain avec MG sur une courte période a également été recommandé comme traitement de la flavobactériose des branchies chez les salmonidés (Sudova et al., 2007).

Dans de rares cas, MG peut être administré aux poissons via leur alimentation. Par exemple, MG a également été utilisé comme fongicide administré dans la farine de poisson et sa présence dans certains aliments commercialisés pour les poissons a été démontrée (Conti et al., 2015).

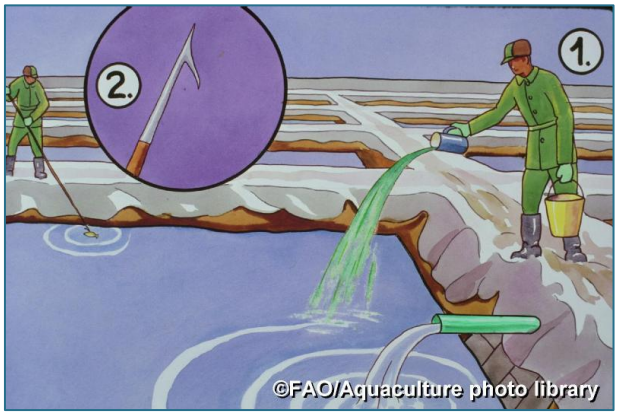


Figure 12 : Traitement d'un bassin d'aquaculture au MG et enlèvement de poissons morts. Source : FAO, http://www.fao.org/fishery/photolibrary/home/en/

↳ Peu d'études sur les propriétés thérapeutiques des TAMs autres que MG

L'efficacité thérapeutique des autres TAMs a été assez peu étudiée. Les propriétés thérapeutiques d'un panel de colorants ont été évaluées par Alderman en 1982. L'équipe développa des tests *in vitro* afin de tester l'efficacité de substances thérapeutiques contre les champignons parasites des poissons (Alderman, 1982). Ces études *in vitro* ont porté sur les effets de 11 TAMs ainsi que de quelques autres composés aux propriétés antifongiques qui ont été appliqués à des cultures de *Saprolegnia parasitica*. Parmi les 40 composés étudiés, le thimérosal, composé contenant du mercure, ainsi que les colorants MG, CV et BG, la monophénylrosaniline (Dahlia) et le vert iodé se sont avérés les plus efficaces. Le tableau ci-

dessous (**Tableau 2**) représente le % d'inhibition du parasite en contact avec différentes concentrations des colorants inclus dans cette thèse. RHB et le Victoria blue 4R présentent un effet à 10 ppm, alors que EV commence à être efficace à partir de 1 ppm. CV, BG et MG agissent déjà efficacement à 1 ppm.

Tableau 2 : Effets antifongiques de colorants étudiés par le protocole 1 [(1)]. Source : (Alderman, 1982)

Colorant	**Croissance en % par rapport au contrôle**		
	A 1 ppm	A 10 ppm	A 100 ppm
Rhodamine B (RHB)	100	16	0
Victoria blue 4R[(2)]	100	7	0
Ethyl violet (EV) [(2)]	21	0	0
Crystal violet (CV)[(2)]	0	0	0
Brilliant green (BG)[(2)]	0	0	0
Malachite green (MG) oxalate[(2)]	0	0	0

(1) Protocole 1: L'organisme sélectionné était Saprolegnia parasitica CBS 302.56. Test d'inhibition sur des disques inoculés sur des plaques d'agar incubées à 16°C pendant 24h.
(2) Colorants Arylméthanes

Dans une étude plus récente (Oros et al., 2002), l'activité fongicide de 10 colorants de formule « triaryl » et de six composés de référence antifongique a été déterminée sur 36 souches fongiques. L'objectif de l'étude était d'examiner l'impact de ces colorants industriels lorsqu'ils sont rejetés dans l'environnement, et leur possible interaction avec la biologie des sols. La matrice de données a été évaluée séparément par analyse en composantes principales (ACP) et par technique de cartographie spectrale. Les propriétés antifongiques du MG, du CV, du BG ont notamment été évaluées. À partir de ces données, il a été déduit que les colorants « triaryl » présentent une activité antifongique comparable ou supérieure à celle des étalons antifongiques de référence; par conséquent, ils peuvent être considérés comme des polluants environnementaux lorsqu'ils sont accumulés dans les eaux souterraines et dans le sol.

⇒ Il n'existe pas de données connues d'usages en aquaculture pour ce panel de colorants et encore moins d'indications thérapeutiques de balnéation, mais la présence de résidus de certains colorants dans les poissons prouve qu'ils sont occasionnellement utilisés, même si leur utilisation reste très en marge de celle du MG. Dans le prochain chapitre, nous allons aborder le devenir de ces substances dans l'organisme, en particulier les TAMs, et leurs effets délétères.

1.3.3 Métabolisme et Toxicité des TAMs

1.3.3.1 Métabolisme

Les études **ADME** (Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion) s'intéressent au devenir du médicament dans l'organisme, ou celui d'autres composés extérieurs à l'organisme, encore appelés **xénobiotiques**. L'ensemble de ses paramètres ADME va conditionner sa toxicité, sa vitesse d'élimination et son profil métabolique.

↳ Définitions des paramètres ADME

- Absorption : L'absorption est le processus par lequel les molécules médicamenteuses accèdent à la circulation sanguine depuis le site d'administration du médicament. La vitesse de ce processus (le taux d'absorption du médicament) et son exhaustivité (le degré d'absorption du médicament) dépendent de la voie d'administration. L'absorption est la résultante de deux phénomènes: la résorption (passage membranaire) et les effets de premier passage (biotransformation métabolique survenant entre l'administration et la distribution générale). L'absorption est souvent incomplète après administration orale (médicaments dénaturés par l'acide gastrique ou liés aux aliments par exemple). La proportion d'une dose qui atteint la circulation systémique indemne est connue comme la biodisponibilité du médicament.

- Distribution : La distribution est le processus par lequel les médicaments se déplacent dans le corps. Après être entrées dans le sang, les molécules médicamenteuses doivent traverser les parois capillaires pour pénétrer dans les tissus, atteindre les membranes cellulaires et pénétrer dans les cellules.

- Métabolisme : Le métabolisme (**Figure 13**) est le processus par lequel les médicaments sont modifiés chimiquement d'une forme liposoluble appropriée pour l'absorption et la distribution à une forme plus soluble dans l'eau qui convient à l'excrétion. Le processus élimine efficacement le médicament parent. Le métabolisme des médicaments se déroule en deux phases:

  - La Phase I, dite de fonctionnalisation**,** au cours de laquelle les molécules du médicament sont modifiées chimiquement (par oxydation, réduction ou hydrolyse) pour les rendre adaptées aux réactions de phase II ou à l'excrétion. L'oxydation est de loin la

forme la plus courante de réaction de phase I et implique principalement des membres de la famille des enzymes du cytochrome P450 (CYP450), localisées à la surface du réticulum endoplasmique lisse des cellules hépatiques. Les métabolites produits sont plus hydrophiles que le composé d'origine et peuvent être rejetés par les transporteurs (par exemple la glycoprotéine P), ou encore biotransformés par les enzymes de phase II.

- **La Phase II**, dite de conjugaison, pendant laquelle des molécules de métabolite de phase I (ou, dans certains cas, de médicament inchangé) se combinent avec un substrat endogène pour former un conjugué inactif qui est beaucoup plus soluble dans l'eau que le métabolite de phase I. Cette conjugaison favorise l'hydrophilie de la molécule puis son excrétion via la bile et l'urine. Les réactions de phase II comprennent la synthèse de glucuronides ou de sulfates, l'acétylation ou la méthylation et la conjugaison avec le glutathion (GSH) grâce à des enzymes spécifiques (glutathion-S-transférases ou GST, UDP glucuronosyltransférases ou UGT…).

Le taux de métabolisme des médicaments varie considérablement d'un individu à l'autre, influencé par des facteurs génétiques et environnementaux. C'est la principale raison des différences interindividuelles dans la concentration plasmatique de certains médicaments après une dose standard, ce qui entraîne une grande variation de la réponse médicamenteuse.

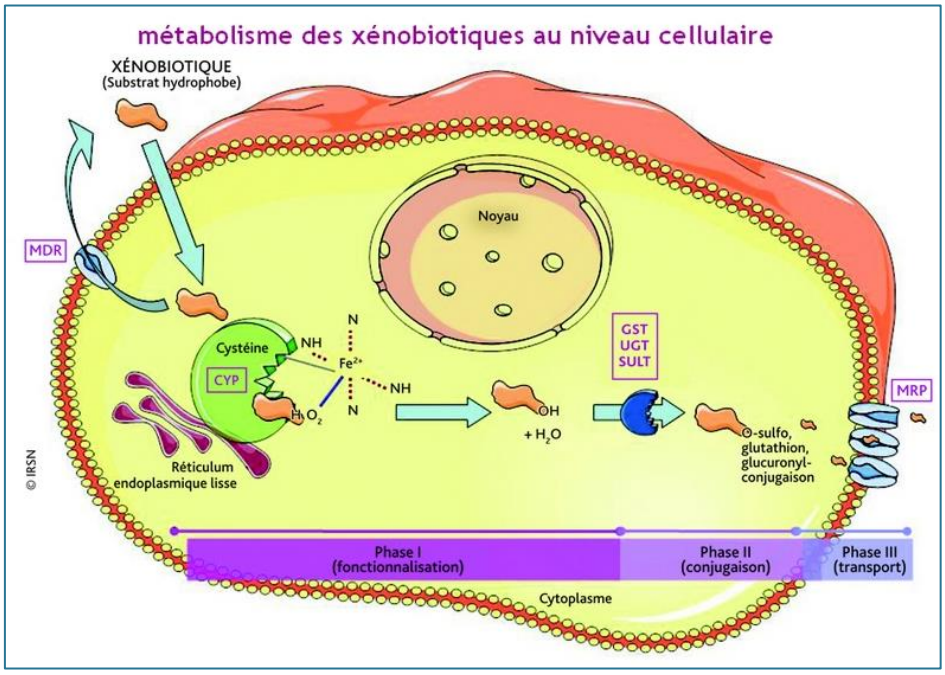


Figure 13 : Les différentes étapes du métabolisme des xénobiotiques. Source : https://www.irsn.fr/FR/Larecherche/publications-documentation/aktis-lettre-dossiers-thematiques/envirhom/xenobiotique/Pages/xeno1.aspx#.XhCkCETLS70

- Excrétion : Enfin, l'excrétion ou phase III du métabolisme, est le processus par lequel les médicaments et leurs métabolites sont éliminés du corps. Ils peuvent être excrétés par les fluides (principalement l'urine et la bile), les solides (fèces) ou les gaz (air expiré).

⇒ Lors de cette étude, nous nous sommes intéressés particulièrement à l'étape de métabolisme, afin de se focaliser sur les résidus marqueurs pour le contrôle réglementaire, et donc au devenir et à la persistance des colorants et de leurs métabolites.

↳ Découverte de LMG *in vivo*

Les principales réactions de biotransformation subies par MG sont de nature réductrice et oxydative. La plupart des résidus du MG dans les tissus des poissons se trouvent sous forme réduite de LMG, stockée dans les tissus et excrétée lentement. Ce métabolite est connu et donc utilisé depuis plusieurs dizaines d'années comme marqueur pour contrôler l'utilisation illégale du MG (Srivastava et al., 2004; Arroyo et al., 2009). L'intérêt pour ce leuco métabolite a démarré par des observations *in vivo* dans les années 80. Poe et Wilson (1983) ont pour la première fois signalé des résidus de MG et LMG dans les tissus des poissons. En effet, MG est immédiatement absorbé par les poissons et métaboliquement réduit en LMG, un composé non polaire et incolore, qui persiste dans les tissus (Poe and Wilson, 1983).

↳ Les conditions expérimentales modifient le métabolisme du MG

La persistance des résidus de MG et LMG dans le poisson dépend de l'espèce et de la taille du poisson, de la concentration et de la durée d'exposition au MG et des conditions environnementales, notamment la température et le pH du bassin aquacole. Dans l'étude d'Alderman et Clifton-Hadley chez la truite, les auteurs ont étudié l'influence de la température, à 8°C et 16°C, sur l'absorption, la distribution et l'élimination du MG. Le pH a été fixé précisément lors de cette étude à 7.6 afin que MG soit converti en forme carbinol à 95 % après un équilibre réalisé pendant 15 h en solution et avant démarrage du traitement. Des temps de demi-vie ($t_{1/2}\beta$) de 0.62 jours (8°C) et 14.5 jours (16°C) ont été respectivement estimés concernant l'élimination du MG dans le sérum de truite après exposition à 1.6 mg/L pendant 40 min. Dans les tissus, comme le muscle, les demi-vies de distribution et d'élimination sont plus longues avec la température de 16°C (Alderman and Clifton-Hadley, 1993).

↳ LMG se stocke dans les tissus, les organes foie et rein plus exposés

LMG est généralement reconnu en tant que principal métabolite du MG et cela dans divers tissus animaux (Roybal et al., 1995; Plakas et al., 1996). Il est principalement stocké dans le sérum, le foie, les reins, les muscles, la peau et les viscères de divers vertébrés, y compris chez les poissons (Clifton-Hadley and Alderman, 1987; Alderman and Clifton-Hadley, 1993; Máchová et al., 1996). Plakas et al (Plakas et al., 1996) ont déterminé les concentrations en MG dans la bile et 8 différents tissus chez le poisson-chat après une exposition en balnéation radiomarquée au ^{14}C-MG (0.8 mg/L pendant 1 h). Les concentrations maximales atteintes dans les tissus sont présentées dans le **Tableau 3**, mettant en évidence une prédominance respectivement dans la bile, le foie, la graisse, et les reins dans l'ordre décroissant. LMG est également le résidu marqueur chez le poisson à un stade précoce de développement, pour les œufs et les alevins, et donc l'objet de développements de méthodes dans ces différentes matrices biologiques (Allen et al., 1994).

Tableau 3 : Concentrations maximales atteintes de résidus radioactifs dans différents fluides et tissus biologiques. Source : (Plakas et al., 1996).

Tissus	Concentration maximale atteinte (mg équivalent MG/kg ou /L)	Temps atteint pour la concentration maximale (h)
Bile	101±41.2	24
Foie	33.4±7.45	0
Graisse	30.3±6.39	168
Haut reins	24.6±4.86	0
Bas reins	22.0±5.38	0
Rate	10.9±2.49	0
Plasma	6.36±1.51	0
Peau	3.99±0.68	0
Muscle	3.18±0.72	0

↳ Une absorption rapide et un stockage long de LMG

Le rôle joué par les branchies dans l'absorption du MG et l'ampleur de la conversion du MG en LMG indiquent que la réduction pourrait également se produire non seulement par voie métabolique, mais aussi directement dans les tissus par oxydo-réduction spontanée selon les conditions physico-chimiques. D'ailleurs, il a été observé qu'inversement, le LMG métabolisé dans le muscle du poisson pouvait se réoxyder en MG lorsque le muscle du poisson était congelé (Poe and Wilson, 1983).

Chez les poissons traités, MG est rapidement éliminé par l'animal tandis que LMG représente la forme prédominante dans les tissus consommés où il peut s'accumuler et persister longtemps en raison de son taux d'excrétion très lent. En effet, la lipophilicité du LMG augmente son temps de résidence dans les tissus adipeux. Dans l'étude de Plakas et al. (Plakas et al., 1996) sur le poisson-chat décrite dans le paragraphe précédent, les résidus du MG se sont bioaccumulés dans les tissus à des concentrations plus élevées que celle du bain d'exposition. Les concentrations moyennes en MG et LMG dans le muscle indiquées sur la **Figure 14** ci-dessous sont révélatrices.

Immédiatement après l'exposition, la concentration de résidus de LMG était légèrement supérieure à celle du MG dans le muscle. Après 14 jours, MG atteignait la limite de détection de la méthode, alors que les concentrations en LMG dans le muscle étaient plus de 40 fois supérieures. LMG était encore quantifiable dans le muscle 42 jours plus tard.

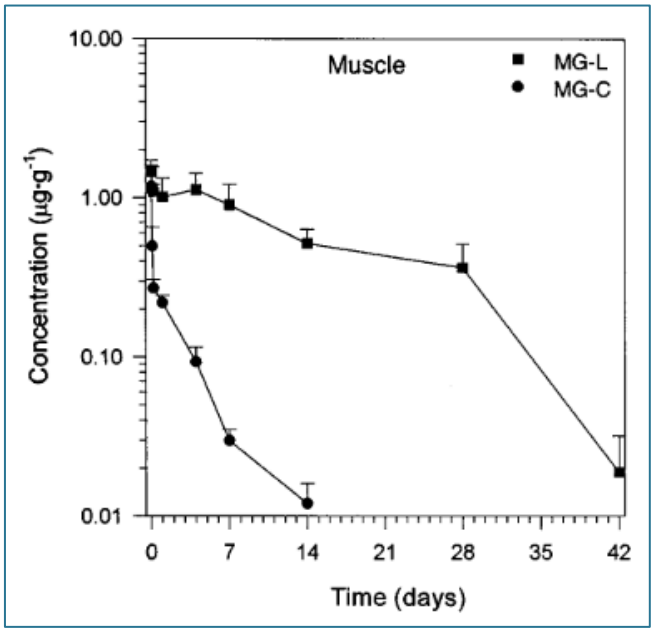


Figure 14 : Concentrations moyennes dans le muscle de poisson-chat en MG (MG-C) et LMG (MG-L) après exposition dans l'eau au MG (0.8 mg/L pendant 1 h). Source : (Plakas et al., 1996).

Jiang et al. (Jiang et al., 2009) ont montré un effet similaire concernant l'absorption rapide du MG et l'élimination lente du LMG. Ils indiquent que l'absorption du MG s'est produite pendant l'exposition et que les concentrations en MG dans les branchies de trois espèces de poissons d'eau douce (*P. pekinensis, C. auratus, O. argus*) ont toutes atteint un maximum pendant les 20 premières minutes d'exposition (6 mg/L de MG pendant 20 min). Les concentrations de MG dans le sang ont également atteint un maximum au tout début de l'exposition tandis que la concentration maximale de LMG a été atteinte entre 2h et 4h. Après cette période, les concentrations de MG et LMG ont rapidement chuté dans le sang (dessous 0.15 µg/mL). Pourtant les niveaux de concentration de MG et LMG dans le muscle étaient toujours supérieurs à 0,002 mg/kg à 240 h et pouvaient persister pendant 10 jours au maximum, avec une concentration en LMG supérieure à celle de MG et dépendante de la teneur en lipides des tissus. Il a été déduit que la plupart du MG a été rapidement converti en LMG chez le poisson, opérant une dépuration lente dans les tissus adipeux, la peau et les gonades.

L'effet du temps d'exposition a été démontré par Bajc et al. (Bajc et al., 2011), plus récemment par une étude d'absorption, d'accumulation et de dépuration dans le muscle et la peau de la truite arc-en-ciel et de la carpe. La truite arc-en-ciel a été exposée à 1 mg/L de MG pendant 1 ou 3 h ou à 1,5 mg/L pendant 1 h. L'augmentation de la dose n'a pas eu d'incidence significative sur les niveaux de résidus chez la truite arc-en-ciel (0,45 et 0,53 mg de MG/kg dans les groupes 1 et 1,5 mg/L, respectivement); cependant, la durée d'exposition a eu une influence majeure.

La truite arc-en-ciel exposée trois fois plus longtemps contenait 4,5 fois plus de MG (2,1 mg/kg) et deux fois plus de LMG (6,0 mg/kg) un jour après l'exposition par rapport à la truite traitée en balnéation d'une heure (0,45 mg de MG/kg et 2,8 mg de LMG/kg). La concentration de LMG chez la truite exposée à 1 mg de MG/L pendant 3 h a continué d'augmenter après la suppression du traitement, atteignant jusqu'à 9,7 mg de LMG/kg après 4 jours. Le niveau de MG chez la truite arc-en-ciel a diminué rapidement et, un jour après le traitement, environ 74 % du total des résidus se trouvait sous leuco-forme. La déplétion de LMG a ensuite été environ trois fois plus longue pour le groupe exposé pendant 3h comparé au groupe exposé une heure.

↳ Quelques études réalisées *in vitro* : métabolisme chez les champignons

Les systèmes *in vitro* permettant de déterminer les principaux métabolites de colorants pharmacologiquement actifs ont été peu utilisés. Les réactions métaboliques avec les enzymes de champignons ont toutefois été observées il y a plusieurs dizaines d'années. La biodégradation du CV ainsi que plusieurs autres TAMs, tels que PRRA, le rouge de crésol, le bleu de bromophénol, EV, MG, et BG, a été mise en évidence par le système enzymatique de la lignine du champignon *Phanerochaete chrysosporium* (Bumpus and Brock, 1988). La disparition du CV a engendré l'apparition de métabolites successivement déméthylés. Ce système de dégradation, contenant des peroxydases, se met en place sous certaines conditions comme un apport en azote excessif ou un manque de nutriments.

La réduction d'oxydoréduction, première réaction métabolique bien connue des TAMs, a par exemple été observée sous la forme d'une biotransformation *in vitro* formant du leuco-MG dans le champignon *Cunninghamella elegans* (Cha et al., 2001). Bien que ces études aient signalé le métabolisme fongique des TAMs, leur réduction par la microflore intestinale a aussi été démontrée par les bactéries commensales de mammifères (rat, souris, singe, homme) (Singh et al., 1994; Henderson et al., 1997).

Plus récemment, des sous-fractions de foie de truite arc-en-ciel ont permis d'évaluer les effets *in vitro* de MG et LMG sur certaines enzymes métabolisant les médicaments (DME) et notamment l'implication du GSH. Les résultats ont suggéré que MG pourrait être un substrat du CYP1A et éventuellement d'autres CYP450, ce qui n'avait été démontré jusqu'à présent que dans les cultures du champignon *Cunninghamella elegans*. MG s'est avéré agir sur la quantité de GSH formé *in vitro* en formant des adduits. Il agit généralement en tant qu'inhibiteur des DME de foie de truite, notamment EROD et GST (Nebbia et al., 2017).

↳ D'autres métabolites identifiés de MG

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent, certaines études *in vitro* ont permis d'identifier préliminairement les métabolites principaux de certains TAMs par oxydo-réduction, comme des composés déméthylés. La détection de métabolites N-déméthylés et N-oxydés de MG et de LMG, incluant une arylamine primaire, dans les filets de poissons-chats traités au MG, a confirmé la présence d'une voie de biotransformation similaire chez les poissons (Doerge et al., 1998). Chez les mammifères également, les études *in vivo* (Culp et al., 1999) ont montré que la voie oxydative de MG ou LMG impliquait principalement la N-déméthylation séquentielle du colorant pour obtenir des dérivés mono-, di-, tri et tétra-déméthylés (**Figure 15**). Les résultats ont également suggéré la génération d'arylamines primaires et secondaires impliquées dans certains mécanismes génotoxiques.

En ce qui concerne le métabolisme de phase II, les données disponibles indiquent que MG subit une excrétion biliaire, éventuellement sous forme d'adduit au GSH. Bien que n'ayant pas été identifiés analytiquement, les autres TAMs formeraient également des adduits au GSH montrés par décoloration lors de différents ajouts de GSH et inhibant la GST (Debnam et al., 1993).

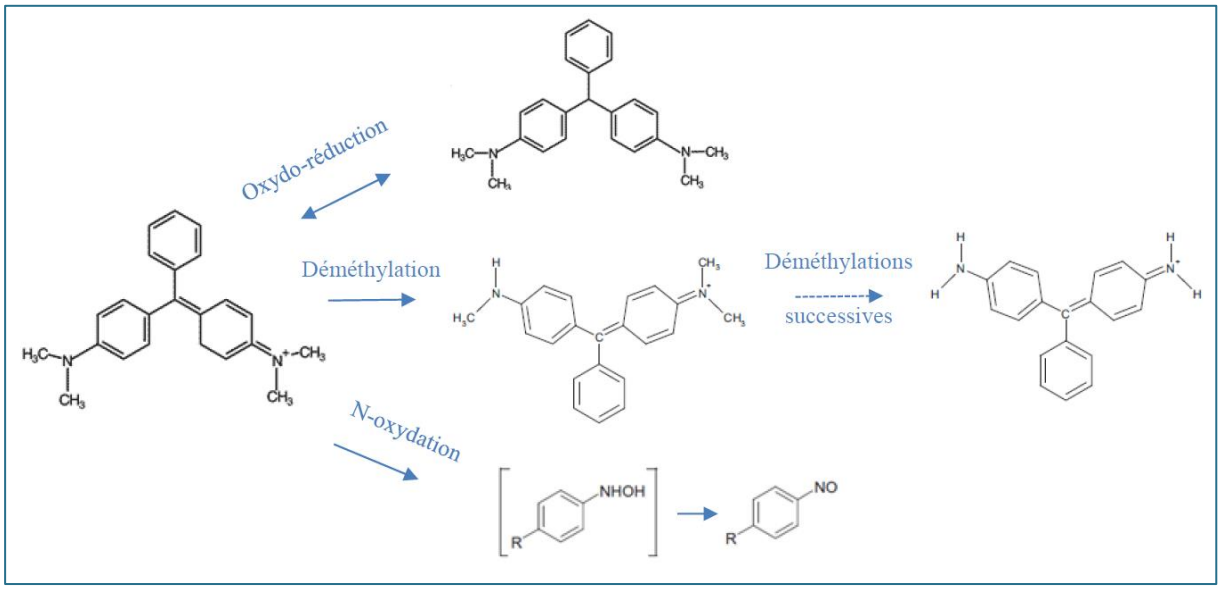


Figure 15 : Voies métaboliques connues du MG (muscle, foie ; mammifères, poissons).

↳ Un métabolisme similaire chez les autres TAMs

Les autres TAMs ont été beaucoup moins étudiés que MG mais quelques études disponibles vont dans le sens d'un métabolisme très proche entre les composés dérivés de cette famille. Comme nous l'avons vu ci-dessus, des réactions de biotransformation ont permis de mettre à

jour l'apparition de métabolites N-déméthylés sur des cultures de mycètes pour 7 triarylméthanes : MG, CV, PRRA, rouge crésol, bleu de bromophénol, EV, BG (Bumpus and Brock, 1988). La formation de ces composés déméthylés n'a pas été confirmée par des études *in vivo*.

Par contre, les leuco-bases ont été recherchées *in vivo* pour caractériser les métabolites marqueurs, notamment pour CV, BG, MB. LCV a été confirmé par de nombreuses études *in vivo* chez différentes espèces de poissons (Dowling et al., 2007; Lee et al., 2010; Chan et al., 2012). Les données concernant le métabolisme de BG sont plus limitées. Les résidus de BG et LBG ont été identifiés dans des échantillons de truites traitées dans un bain de BG. Immédiatement après l'exposition au bain, les résidus de BG et LBG étaient dans une proportion égale dans le muscle de truite. Deux heures après l'exposition, la concentration de résidus de LBG dans le muscle dépassait des deux tiers celle de résidus de BG (Hurtaud-Pessel et al., 2011). Cependant, LBG s'oxyde facilement en BG, ce qui limite les conditions physico-chimiques propres à stabiliser ce composé et entraîne l'absence de standard disponible dans le commerce. Cela limite les études analytiques permettant d'identifier et confirmer sa présence. Dans une autre étude, LBG n'a pas été identifié dans des échantillons de saumon, de poisson-chat et de tilapia ayant été exposés à un bain à faible concentration (10 µg/L) de BG et seul BG était parfaitement identifiable (Schneider and Andersen, 2015).

Ces études suggèrent que le composé parent BG serait un résidu marqueur acceptable pour détecter un traitement avec ce colorant, tandis que les tests réglementaires pour MG et CV doivent inclure la contribution des formes leuco, qui ont une plus grande stabilité que leur forme parentale et un temps de résidence plus long dans le muscle du poisson.

⇒ Conclusion sur les métabolites des principaux triarylméthanes inclus dans cette thèse

Les métabolites du MG ont largement été caractérisés, bien que certaines données complémentaires pourraient sembler nécessaires, comme une recherche plus approfondie de métabolites de phase II. Les leuco-formes semblent dominantes comme voie de biotransformation pour les triarylméthanes et ont donc été définies comme résidus marqueurs, sauf pour BG. Par contre, les dérivés de la famille des Victoria n'ont pas fait l'objet d'études de caractérisation de leurs métabolites.

1.3.3.2 Toxicité

L'étude de la toxicité d'un xénobiotique, substance étrangère à un organisme, se décline en différentes étapes que sont : l'identification et la caractérisation du danger, l'étude de l'effet dose-réponse et l'évaluation du risque. Un ensemble de tests *in vitro* et *in vivo* permettent de caractériser la toxicité d'un xénobiotique, de définir son mode d'action, les organes cibles, et les doses sans effets nocifs observables (NOAEL).

Nous avons vu dans le paragraphe précédent que MG surtout et certains TAMs, étaient rapidement absorbés dans l'organisme, se métabolisaient principalement en forme réduite leuco, et s'accumulaient sous cette forme dans les tissus de poisson pendant des semaines voire des mois. Une fois que les paramètres d'ADME sont connus, il est important de clarifier l'impact de nos colorants du point de vue toxicologique sur les organismes.

L'objet de cette partie sur la toxicité n'est pas de faire une revue exhaustive de la littérature mais de fournir les éléments clés des effets toxiques de MG et LMG, et des TAMs, qui ont contribués à la détermination des valeurs toxicologiques de référence à la base de la réglementation actuelle sur l'usage des triarylméthanes. Le **Tableau 4** récapitule les études clés, les effets associés et les NOAELs dérivant de ces études pour MG et LMG.

↳ La toxicité du MG et LMG

La DL50 la plus basse du MG a été fixée à 275 mg/kg sur la base d'une étude chez le rat Wistar après une exposition unique par gavage (Cleinmensen et al., 1984), ce qui conduit à une classification comme toxique en cas d'ingestion selon le règlement CLP 1272/2008 (Commission Européenne, 2008). Les principaux effets chez l'animal après une exposition aiguë sont une dilatation et une hyperhémie intestinale.

Aucune étude n'est disponible permettant de déterminer la DL50 du LMG.

↳ La toxicité à doses répétées

Les études disponibles sur la toxicité à doses-répétées du MG par voie orale indiquent que MG provoque une augmentation du poids du foie et des modifications des paramètres sanguins chez le rat et la souris après 28 jours d'exposition orale (Culp et al., 1999). Une NOAEL de 9,4 mg/kg p.c/j peut être fixée sur la base de modifications hématologiques observées chez les rats femelles à 94 mg/kg p.c/j (**Tableau 4**).

Le LMG induit également une augmentation du poids du foie et une modification des paramètres sanguins chez le rat mâle après une exposition de 28 jours dans la nourriture (Culp et al., 1999; Culp, 2004). Toutefois, aucune NOAEL du LMG ne peut être fixée sur la base de cette étude.

↳ La toxicité pour le développement et la reproduction

MG a montré induire une toxicité fœtale après une exposition par voie orale de lapines gestantes avec une diminution du nombre de fœtus vivants et une augmentation des anomalies squelettiques observées à toutes les doses, c'est pourquoi aucune NOAEL n'a pu être fixée (Meyer and Jorgenson, 1983).

LMG induit une toxicité maternelle et fœtale chez le rat Sprague-Dawley femelle après une exposition entre les jours 6 et 18 de gestation. Une augmentation des anomalies squelettiques chez les fœtus apparait également. Une NOAEL de 10 mg/kg p.c/j a pu être fixée à partir de cette étude.

↳ La cancérogenèse

Le potentiel cancérogène du MG a été évaluée dans deux études chez l'animal (souris et rat). Aucun effet cancérogène du MG n'a été mis en évidence chez la souris B6C3F1 mâle ou femelle après une exposition via l'alimentation pendant 2 ans jusqu'à 63 mg/kg p.c/j (Culp, 2004; Culp et al., 2006).

Chez le rat, une faible augmentation de l'incidence d'adénomes folliculaires de la thyroïde et des carcinomes de la glande mammaire ont été observées. Même si ces effets ont été considérés comme faiblement pertinent pour classer MG comme composé cancérogène, le potentiel génotoxique *in vitro* et *in vivo* du MG a conduit l'EFSA à le proposer comme cancérogène (EFSA, 2016).

LMG a également montré des propriétés cancérogènes chez le rongeur, avec une augmentation des adénomes et des carcinomes hépatocellulaires chez la souris après une exposition au LMG via la nourriture pendant 2 ans (NTP, 2005; Culp et al., 2006). Suite à cette étude, il a été possible de définir une benchmark dose de 10 % (BMD10), c'est-à-dire la dose qui induit une augmentation de 10 % des tumeurs, de 13,1 mg/kg p.c/j.

Tableau 4 : Toxicité *in vivo* de MG et LMG. Source : (EFSA, 2016)

Toxicité aiguë					
MG					
Voie d'exposition	**Espèces**	**DL50**	**Effets**	**Référence**	
Voie orale-Gavage	Rat Sprague-Dawley Femelle	520 mg/kg p.c	Depression, prostration, coma, mort	(Meyer and Jorgenson, 1983)	
	Rat Wistar	275 mg/kg p.c	Hyperhémie et atonie intestinale, dilatation tractus intestinale. Absence de dismorphisme sexuelle	(Cleinmensen et al., 1984)	
LMG *: Aucunes données disponibles*					
Toxicité à doses répétées					
MG	**Espèces**	**Traitement**	**Effets**	**VTR**	**Référence**
Nourriture, 0, 0,9, 9,4 and 94,5 mg/kg p.c/j	Rats M et F Nourriture	28 jours	Hyperactivité, diminution du gain de poids et de la consommation de nourriture, ↑ lymphocytes ↓ neutrophiles ↑ urée plamatique	9,4 mg/kg p.c/j (modifications hématologiques rats femelles)	(Culp et al., 1999)
LMG					
Nourriture, 0, 30, 60 and 115 mg/kg p.c/j	Rat mâle Fisher 344	28 jours	↓ Poids corporel ↓ Hématocrite, neutrophiles ↑ Poids du foie	LOAEL 30mg/kg p.c/j	(Culp et al., 1999; Culp, 2004)
Toxicité pour le développement et la reproduction					
MG					
Gavage, 0, 5, 10, 20 mg/kg p.c/j	Lapines gestantes New-Zealand	De J6 à J18 de gestation	↑ résorptions ↓ fœtus vivants ↑Anomalies squelettiques	LOAEL 5 mg/kg p.c/j	(Meyer and Jorgenson, 1983)
LMG					
Gavage, 0, 10, 80, 160 mg/kg p.c/j	Femelles Sprague-Dawley	De J6 à J15 de gestation	↑ Perte implantation ↑Anomalies squelettiques	10 mg/kg p.c/j	(Wan et al., 2011)
MG					
Nourriture, 0, 5, 15, 30 mg/kg p.c/j () 6, 17, 37 mg/kg p.c/j ()	Rat F344	2 ans	Légère augmentation des adénomes folliculaire de la thyroïde et des carcinomes de la glande mammaires	$BMDL_{10}$ 13/mg p.c/j	(NTP, 2005)
LMG					
Nourriture, 0, 13, 31, 63 mg/kg p.c/j	Souris B6C3F1	2 ans	↑ adénomes et des carcinomes hépatocellulaires	/	(NTP, 2005; Culp et al., 2006)

↳ Génotoxicité du MG et du LMG

De nombreuses études *in vitro* et *in vivo* ont été réalisées pour déterminer la capacité génotoxique du MG. Alors que MG est considéré négatif *in vitro* lorsqu'il est soumis aux tests réglementaires, il a montré induire des cassures de l'ADN dans le test des comètes (Fessard et al., 1999). *In vivo*, MG a montré induire des micronoyaux dans la moelle osseuse chez la souris et à former des adduits à l'ADN dans le foie de rat et de souris (Culp et al., 1999).

L'ensemble de ces données a conduit l'EFSA à proposer MG comme mutagène *in vivo*.

Le profit génotoxique du LMG est assez similaire, avec une induction des mutations géniques observés *in vivo* chez la souris et la formation d'adduits à l'ADN au niveau du foie de souris. Ces effets ont conduit l'EFSA à considérer LMG comme mutagène *in vivo*.

↳ Effets toxiques chez les poissons

Chez la truite arc-en-ciel, des anomalies significatives du développement des œufs, principalement des ruptures chromosomiques, ont été signalées après une intoxication prolongée au MG. Un déclin marqué de la survie des embryons survient suite à une fertilisation de 38 h après une exposition prolongée à de fortes doses de MG; il existe des preuves d'un retard à l'éclosion et d'anomalies de la colonne vertébrale, de la tête, des nageoires et de la queue chez les alevins éclos de truite arc-en-ciel (Meyer and Jorgenson, 1983).

MG agit également comme un poison enzymatique respiratoire (Werth and Boiteux, 1968) et provoque une détresse respiratoire chez la truite arc-en-ciel (Ross et al., 1985). Une augmentation du taux de ventilation et du taux de respiration des truites ont été observés probablement attribués à un encrassement particulier des branchies, à la production de mucus et à des lésions épithéliales.

↳ Mécanisme d'action toxique de MG et LMG

En raison de sa structure en iminium, MG peut se comporter comme accepteur/donneur d'électrons conduisant à la formation d'espèces radicalaires oxygénées pouvant affecter certains processus cellulaires (par exemple la respiration mitochondriale). En effet, un cycle d'oxydoréduction *in vivo* avec l'oxygène peut survenir, donnant lieu à un stress oxydant par la génération d'espèces réactives de l'oxygène, telles que le peroxyde d'hydrogène, les hydroperoxydes, les peroxydes d'alkyle et divers radicaux (hydroxyle, alkoxyle, hydroperoxyle

et superoxyde) (Kovacic and Somanathan, 2014). En tant que colorant triarylméthane électrophile, MG peut former des adduits avec le GSH, les protéines et les nucléophiles liés aux protéines, pouvant éventuellement entraîner l'inhibition de l'activité enzymatique (Eldem and Özer, 2004; Tacal and Özer, 2004). De plus, MG et LMG peuvent être oxydés par le CYP450, produisant des amines primaires et secondaires; et aromatiques, ces métabolites peuvent subir une oxydation plus poussée, donnant ainsi lieu à des intermédiaires instables (-NHOH) et des dérivés nitroso- (-NO). Ces métabolites d'amines aromatiques secondaires et primaires pourraient se lier à l'ADN et former des adduits (Wang et al., 2012). Tous ces effets expliqueraient la capacité de MG et LMG à induire des tumeurs au niveau hépatique chez l'animal.

De plus, LMG a montré inhiber la thyroïde peroxydase *in vitro*, ce qui expliquerait les effets observés chez l'animal et les carcinomes folliculaires de la thyroïde (NTP, 2005).

⇒ Bilan de la toxicité de MG et LMG

L'ensemble de ces données montrent que le MG et le LMG ont un profil toxicologique très proche. La biotransformation du MG en LMG ne modifie pas sa toxicité.

Le MG et son métabolite majoritaire, LMG, sont des composés génotoxiques, cancérogènes et reprotoxiques chez l'animal.

Les effets potentiellement délétères du MG et du LMG pour la santé humaine et environnementale ont conduit les autorités à interdire son utilisation en aquaculture et à définir des niveaux de contaminations dans les aliments à ne pas dépasser.

↳ Une toxicité moins étudiée mais qui semble similaire chez les autres TAMs

De même que pour les études ADME, les données existantes de la littérature ainsi que les similarités entre structures nous laissent supposer des effets toxiques similaires pour les autres TAMs.

Le **Tableau 5** résume les données de toxicité des TAMs disponibles dans la littérature et les données issues des analyses QSAR pour les propriétés génotoxiques et cancérogènes. De manière générale, les TAMs présentent une toxicité aiguë par voie orale assez importante avec des DL100 ou 50 comprises entre 3 et 750 mg/kg en fonction des composés.

L'ensemble des TAMs ont été classés comme génotoxiques soit sur la base de données disponibles, pour le VBR en particulier, soit en faisant une comparaison de structure en utilisant les bases de données ouvertes de l'ECHA, celles du Danemark et les modèles QSARs disponibles (EFSA et al., 2017a). De même, l'ensemble des TAMs ne présente pas de structures chimiques à haut potentiel cancérogènes. Cependant leur propriétés génotoxiques en font des composés cancérogènes en-soi. Ces données ont permis à l'EFSA de définir des Toxicological Screening Value (TSV, valeurs de dépistage toxicologiques) fondées sur des considérations analytiques et toxicologiques, permettant de les classifier (ci-après).

Tableau 5 : Données de toxicité disponibles sur les TAMs et leurs dérivés permettant le calcul des TSV respectives. Source : (EFSA et al., 2017a)

Colorants	**Toxicité aiguë**	**Toxicité répétée**	**Génotoxicité**	**Cancérogenèse**	**Reprotoxicité**	**TSV (µg/kg p.c/j)**
Brilliant green (BG)	DL 3mg/kg pc, iv, souris (1)	AD	+ *	-**	AD	0,0025
Crystal violet (CV)	DL50 96 mg/kg pc, v.o, souris (2)	AD	+ *	-**	AD	0,0025
Ethyl violet (EV)	DL 320 mg/kg pc, vo, souris (3)	AD	+ *	-**	AD	0,0025
Pararosalinine	ND	AD	+ *	- Rat, IP (4)	AD	0,0025
Victoria blue B (VBB)	ND	AD	AD	AD	AD	-
Victoria blue R (VBR)	DL50 750 mg/kg, vo, souris (5)	AD	+ in vivo (6)	-**	AD	0,0025
Victoria pure blue bo (VPBO)	AD	AD	+ *	-**	AD	0,0025

* Données QSAR, ** n'appartient pas à une classe chimique à haut potentiel cancérogène, AD = absence de données, IV = intraveineuse, v.o = voie orale

(1) (Anderson et al., 1934)
(2) (Brock and Erhardt, 1951)
(3) (Schafer Jr and Bowles Jr, 1985)
(4) (Ketkar and Mohr, 1982)
(5) https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Victoria-Blue-R#section=Toxicity
(6) (EFSA et al., 2017b)

↳ La récente classification des colorants par l'EFSA

Nous avons vu que les TAMs présentent un risque de toxicité comme MG, LMG, ainsi que la famille des Victoria blue par exemple, et peuvent s'accumuler dans les tissus de poisson. Aussi, l'EFSA a délivré ses opinions scientifiques dans un rapport d'évaluation sur la toxicité d'une liste de colorants. Il a été examiné l'intérêt d'établir une limite règlementaire appelée RPA (Reference Point for Action) pour ces substances actives pharmacologiques non autorisées. La notion de RPA sera détaillée dans le chapitre 2.1. Dans ce rapport (EFSA et al., 2017a), 22 colorants de différentes classes font l'objet de cette évaluation toxicologique afin de fixer une TSV selon un arbre décisionnel (**Figure 16**).

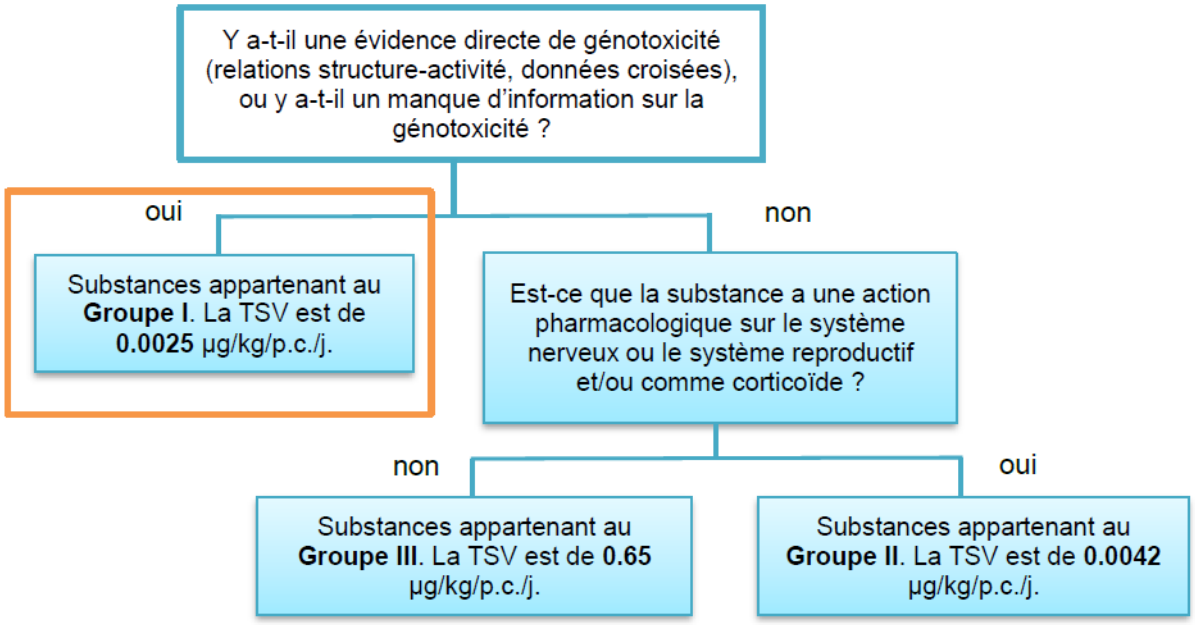


Figure 16 : Arbre décisionnel pour assigner des TSV pour les substances non autorisées à activité pharmacologique . Source : (EFSA, 2013b; EFSA et al., 2017a)

Parmi cette liste, 12 colorants ou métabolites ont été plus particulièrement étudiés au cours de cette thèse en étant intégré à une démarche de développement analytique. Il s'agit de : VPBO, BG, LBG, VBB, CV, LCV, EV, MB, VBR, NBA, PRRA, RHG. Pour chaque substance, plusieurs questions relatives à la toxicité ont été examinées par l'EFSA:

Tableau 6 : Questions évaluées afin d'établir une TSV pour une liste de colorants. Source : (EFSA et al., 2017b)

Q1 : La substance a-t-elle un haut pouvoir carcinogène ?
Q2 : La substance provoque-t-elle de l'allergie ?
Q3 : La substance provoque-t-elle de la dyscrasie* ?
Q4 : Y a-t-il une évidence directe de génotoxicité, ou un manque de preuve concernant la génotoxicité ?
Q5 : La substance agit intentionnellement sur le système nerveux ou le système reproductif et ou/ est-ce un corticoïde ?

*Trouble de la coagulation sanguine

Les réponses associées de l'EFSA ont été formulées en s'appuyant sur les données existantes dans la littérature. Sur les 12 colorants ou métabolites listés ci-dessus, les questions Q1, Q2, Q3, Q5 ont reçues une réponse par la négative (**Tableau 6).** Seule une réponse positive a été apportée à la question Q4, et cela pour tous les colorants, en raison d'un manque d'information et de données scientifiques sur la génotoxicité de ces composés. Selon l'arbre décisionnel, une **TSV de 0,0025 µg/kg pc par jour** a été fixée pour cette dernière raison. Cette TSV est dérivée du concept pragmatique de seuil de considération toxicologique ou Threshold of Toxicological Concern (TTC) développé par Munro (Munro et al., 2008). Il est considéré que pour les composés génotoxiques susceptibles d'être retrouvés dans l'alimentation, une exposition de 0,0025 µg/kg pc/j n'entraine pas un risque supplémentaire de cancérogenèse.

2 La surveillance des résidus de colorants dans les denrées alimentaires

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

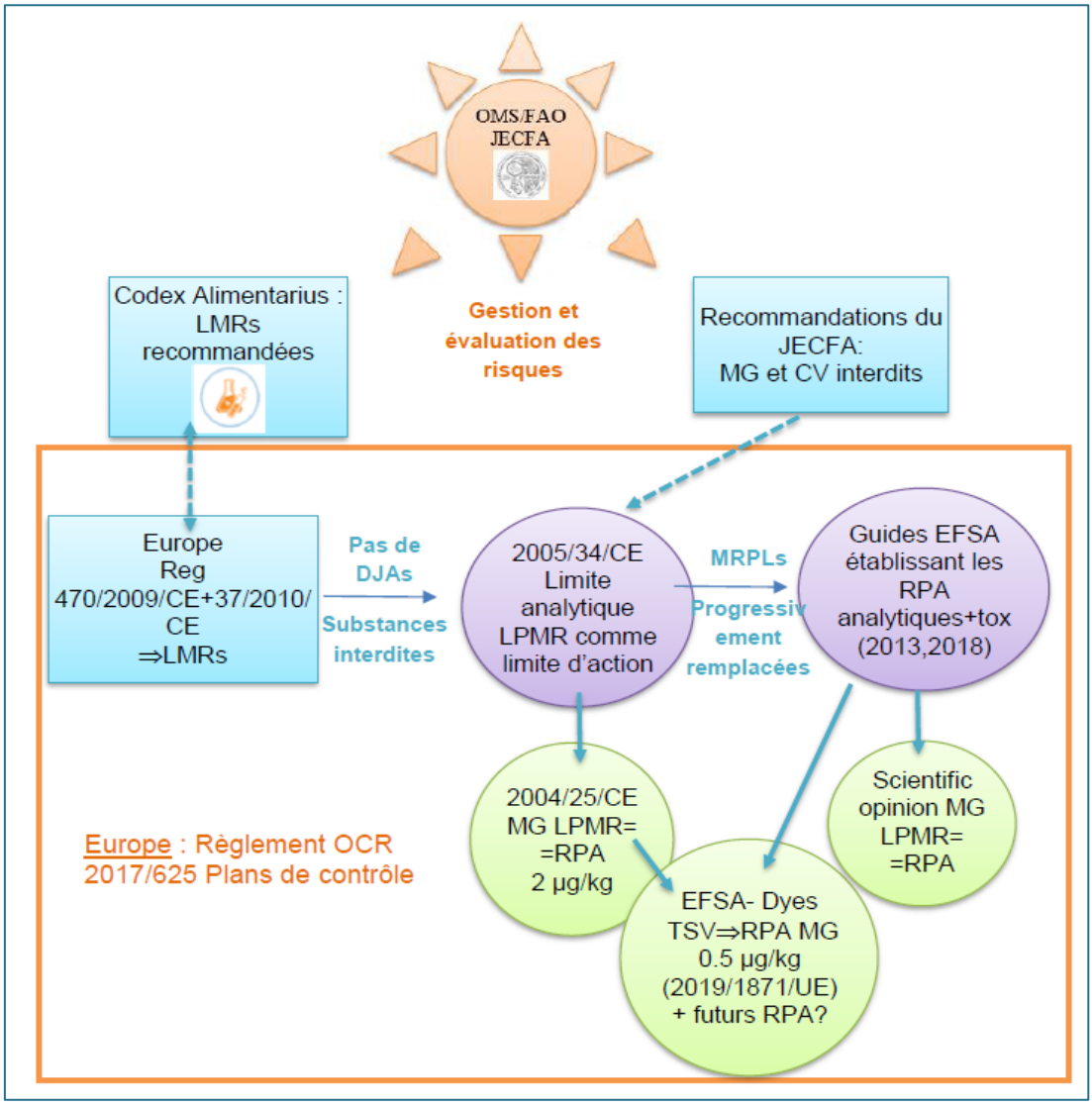


Figure 17 : La réglementation européenne des colorants dans les produits d'aquaculture

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

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

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

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

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

2.2.1 Instrumentation : le couplage usuel

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

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

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

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

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

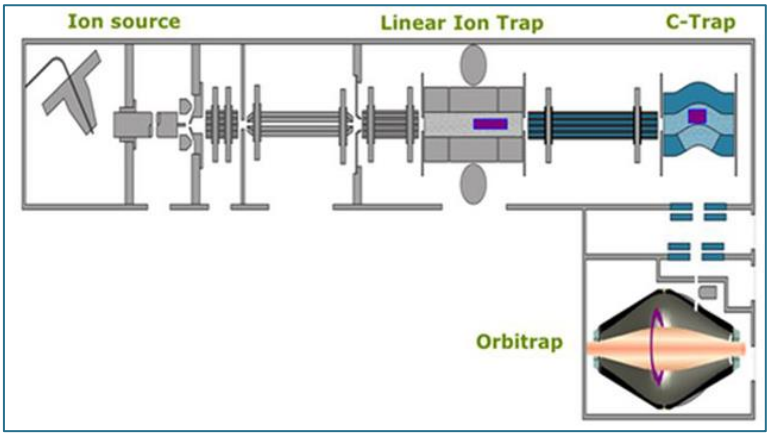


Figure 18 : Représentation schématique du spectromètre de masse hybride LTQ-Orbitrap® Source: https://research.stowers.org/proteomics/MassSpec.html

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

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

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

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

↳ Les conditions classiques de détection des colorants

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

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

↳ La quantification totale convertie par oxydation

Un certain nombre d'articles ont été publiés sur la détection dans le poisson du MG total extrait après application d'une procédure d'oxydation de toute la substance LMG présente dans l'échantillon (Roybal et al., 1995; Andersen et al., 2005; Turnipseed et al., 2005; Tarbin et al., 2008; Lee et al., 2010). Cette procédure permet de d'oxyder la leuco-base de MG en forme parent et ainsi pouvoir quantifier qu'une seule forme. Le processus d'oxydation a également été appliqué à CV (Chan et al., 2012) et BG, ce qui comporte l'intérêt d'avoir une seule quantification, et dans le cas du BG, l'oxydation pallie le fait de ne pas avoir de standard analytique du LBG (manque de stabilité et standard non commercial). L'analyse totale du BG a aussi été effectuée dans le cadre d'une étude de transfert du BG provenant de la coloration de serviettes en papier et vers la peau (Oplatowska et al., 2011). Les méthodes oxydatives ont tout d'abord été appliquées en réaction post-colonne en utilisant de l'oxyde de plomb (PbO2) avec des valeurs de limites analytiques CCα pour MG de 0,11 µg/kg (Scherpenisse and Bergwerff, 2005) (limite CCα explicitée au paragraphe 2.3.1). En 2005, l'extraction présentée par Roybal (Roybal et al., 1995) a été simplifiée et une procédure d'oxydation in situ a été incorporée à la procédure d'extraction afin de convertir la leucobase LMG en MG grâce à l'ajout de 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone (DDQ). Cela permettait une analyse sensible par HPLC-VIS de la somme de MG et LMG dans le saumon et une quantification avec confirmation de l'identité du résidu par LC-MSn à des concentrations inférieures ou égales à 1 µg/kg et une limite analytique CCα pour la surveillance réglementaire estimée à 0,25 µg/kg (Turnipseed et

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

↳ Les solvants d'extraction

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

↳ Les problèmes d'effets matrices

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

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

↳ Les techniques de purification

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

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

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

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

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

2.2.3 Méthodes multi-colorants et multi-familles de colorants

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

↳ Des méthodes surtout dédiées aux TAMs

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

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

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

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

↳ Vers des méthodes multi-familles et multi-classes

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

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

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

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

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

Colorants analysés	Matrice	Préparation d'échantillons	Méthode d'analyse	Colonne	Limites analytiques (LOD ou CCα)	Référence
Méthodes de confirmation comprenant moins de 3 colorants (triarylméthanes)						
MG	poisson chat	acétate de sodium, HAH, p-TSA, ACN, d-SPE	Particle beam-LC-MS	Ultracarb C18	20 µg/kg	(Turnipseed et al., 1995)
CV, LCV	poisson chat	acétate d'ammonium, HAH, p-TSA, ACN	LC-APCI-MS	SCD 100 (5µm, 250 × 4.6 mm) SynChrom	< 1 pg	(Doerge et al., 1996)
MG, LMG	poisson chat	acétate d'ammonium HCl, acide p-toluène sulfonique, ACN, SPE	isotope dilution LC-APCI-MS	Prodigy ODS-3 (5 µm, 4.6 × 250 mm) Phenomenex	0.02 µg/kg (pour MG), 0.5 µg/kg (LMG)	(Doerge et al., 1998)
MG, LMG	poisson chat, anguille, truite, saumon, turbot, crevettes	Tampon McIlvaine à pH 3 puis pH 6, ACN, SPE cations (acide sulfonique)	LC–MS/MS	Luna C18 (3µm, 50 × 2 mm) Phenomenex Post colonne oxidation	0.2 µg/kg	(Bergwerff and Scherpenisse, 2003)
MG, LMG	truite	acétate d'ammonium, HAH, p-TSA, ACN, CH_2Cl_2, SPE automatisée ASPEC (échange cations, acide sulfonique)	LC-MS/MS	Chromspher 5B, Post colonne oxidation	2.5 µg/kg (pour MG) 1 µg/kg (pour LMG)	(Halme et al., 2004)
MG, LMG	saumon, truite, panga, tilapia, perche	McIlvaine buffer pH3, ACN, SPE(échange cations, acide sulfonique)	LC-MS/MS	Luna C18 (3µm,150 × 2.0 mm) Phenomenex	0.11 µg/kg (pour MG et pour LMG)	(Scherpenisse and Bergwerff, 2005)

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

MG, LMG, CV, LCV	saumon	Tampon Mc Illvaine pH 3, ACN, SPE échange cation MCX	LC-MS/MS	C18 (3 µm, 100 × 2.0 mm) Phenomenex	0.17 (MG), 0.15 (LMG), 0.35 (CV) and 0.17 (LCV) µg/kg	(Dowling et al., 2007)
MG, LMG	saumon	Tampon Mc Illvaine pH 4.5, ACN	LC-MS/MS, dilution isotopique	Symmetry C18 (3.5 µm, 75 × 4.6mm) Waters	2 µg/kg	(Hall et al., 2008)
MG, LMG	bar, truite, daurade et turbot	hydroxylamine, ACN	LC-MS/MS	Synergi MAX-RP (4 µm, 150 × 2.0 mm) Phenomenex	0.45-0.55 µg/kg	(Arroyo et al., 2009)
MG, LMG, CV, LCV	poisson chat	Tampon Mc Illvaine pH 3, ACN, SPE échange cation	LC-MS/MS, oxidation post colonne	Prodigy ODS-3 C18 (3 µm, 100 mm× 2.0 mm) Phenomenex	0.5 µg/kg	(Chen and Miao, 2010)
MG,LMG (convertit en MG)	saumon	Acétate d'ammonium, hydroxylamine, ACN, SPE dispersive, oxidation, MIP	LC-MS/MS	Eclipse XDB-C8 (5 µm, 150 × 4.6 mm) Agilent Technologies	3-20 ng/kg	(Martínez Bueno et al., 2010)
MG, LMG, CV, LCV	saumon, crevette	Extraction Accélérée par Solvant (ASE) avec tampon Mc Illvaine (pH 3)/acetonitrile/hexane, p-TSA, TMPD, SPE MCX	LC-MS/MS	Hypersil Gold C18 (3.5 µm, 150 × 2.1 mm) Thermo	0.005-0.012 µg/kg	(Tao et al., 2011)
MG, LMG, CV, LCV	saumon, crevette	Tampon citrate, ACN, NaCl, CH_2Cl_2, SPE SCX	LC-MS-MS	C18 (5 µm, 150 × 2.0 mm) ACE, oxidation post colonne (PbO_2)	0.164-0.860 µg/kg	(Ascari et al., 2012)

CV, LCV	saumon	Méthode 1: acétate d'ammonium, ACN, oxidation, SPE SCX Méthode 2: tampon citrate, ACN, SPE SCX	LC-MS/MS	Méthode 1: Xbridge C18 (3.5 µm,100 × 2.1 mm), Waters Méthode 2: HyPurity C18 (3 µm, 50 × 2.1 mm) Thermo	2 µg/kg	(Chan et al., 2012)
MG, LMG	tilapia	ACN, acide acétique, Quechers: $MgSO_4$ anhydre, PSA	LC-MS/MS	C18 Xterra (5 µm, 150 × 2.1 mm) Waters	0.25-0.38 µg/kg	(Hashimoto et al., 2012)

Colorants analysés	**Matrice**	**Préparation d'échantillons**	**Méthode d'analyse**	**Colonne**	**Limites analytiques (LOD ou CCα)**	**Référence**
Méthodes de confirmation multi-colorants et multi-familles de colorants						
MG, LMG, CV, LCV, EV, PRRA, VBR, VPBO, MB, NMB, BG, VBB, RHG, AZB, NBA	saumon	acétate d'ammonium, ACN, Al_2O_3, acide formique, oxidation DDQ, SPE échange cations SCX	LC-MS/MS	Xbridge C18 (3.5 µm, 100 × 2.1 mm) Waters	1.1-14 µg/kg	(Tarbin et al., 1998)
MG, LMG, CV, LCV, BG	poisson chat	acétate d'ammonium, HAH, p-TSA, ACN, Alumine, dichlorométhane, oxidation DDQ, SPE alumine+acide propylsulfonique	IT-LC-MSn	YMC phenyl 3-4-5 (3 µm, 50 × 4.0mm)	0.07–0.24 µg/kg	(Andersen et al., 2009)
MG, LMG, CV, LCV, BG	truite, saumon, crevette	acétate d'ammonium, HAH, ACN, sulfate de sodium anhydre	LC-MS/MS	Symmetry C18 (3.5 µm,100 × 2.1 mm) Waters	0.13-0.42 µg/kg	(Hurtaud-Pessel et al., 2011) (Hurtaud-Pessel et al., 2013)

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

III, IV, chrysoïdine						
MG, LMG, CV, LCV, BG, LBG	bar, daurade, maquereau, saumon	HAH, ACN, tampon citrate, SPE dispersive Quechers	LC-Q-exactive-HRMS	Hypersil Gold C18 reversed-phase UHPLC column (1.9 µm, 50 × 2.1mm) Thermo Scientific	0.55-0.62 µg/kg	(Giaccone et al., 2018)
MG, LMG, CV, LCV, EV, PRRA, VBR, VPBO, MB, NMB, BG, VBB, RHG, RHB, AZB, NBA	truite, saumon, crevette	ACN, MgSO4, oxydation DDQ	LC-MS/MS	Kinetex C18 (2.6 µm, 100 × 2.1 mm) Phenomenex	0.02-0.42 µg/kg	(Dubreil et al., 2019)

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

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

Confirmation: 16 sulfamides, 2 tetracyclines, 11 (fluoro)quinolones, 7 nitroimidazoles, 3 amphenicols, 5 steroïdes, and 3 stilbènes Screening:5 colornats triphénylmethane, 2 sulfamides, 2 tetracyclines, et 1 amphenicol	saumon (poisson gras), tilapia (poisson maigre), crevettes (crustacés)	ACN, acide formique	LC-MS/MS	Waters (50 × 2.1 mm, 1.7 µm) HSS T3 UPLC	0.1 µg/kg	(Gibbs et al., 2018)
VDs incluant quinolones, fluoroquinolones, avermectines, triarylméthanes, aminopénicillines	Poisson chat, truite, saumon, anguille, croasseur jaune, tilapia	acide p-toluène sulfonique, acide acétique, ACN, SPE	LC-Q-exactive HRMS	Ascentis Express C18 (7.5 cm × 2.1 mm, 2.7 µm) Supelco	1-200 µg/kg	(Turnipseed et al., 2018)
sulfamides, tetracyclines, quinolones, MG	huître, pétoncle, calmar, seiche	ACN, acide acétique, Quechers	UHPLC-MS/MS	ACQUITY UPLC BEH	<0.8 µg/kg	(Chen et al., 2019)
21 substances interdites incluant nitroimidazoles, nitrofuranes, triaryméthanes, chloramphenicol	saumon, truite, crevette	HCl, dérivatisation (nitrobenzaldéhyde), K_2HPO_4, isohexane, NaCl, EtOAc, ACN, $MgSO_4$	LC-MS/MS	Symmetry C18 analytical column (5 µm, 100 × 2.1 mm) Waters	0.067-1.655 µg/kg	(Chen et al., 2020)

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

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

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

↳ Des méthodes d'extraction plus simples

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

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

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

↳ Des méthodes souvent applicables pour le dépistage

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

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

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

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

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

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

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

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

↳ les critères d'identification,

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

↳ les critères de quantification,

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

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

↳ les limites analytiques : la limite de décision (CCα) et la capacité de détection (CCβ).

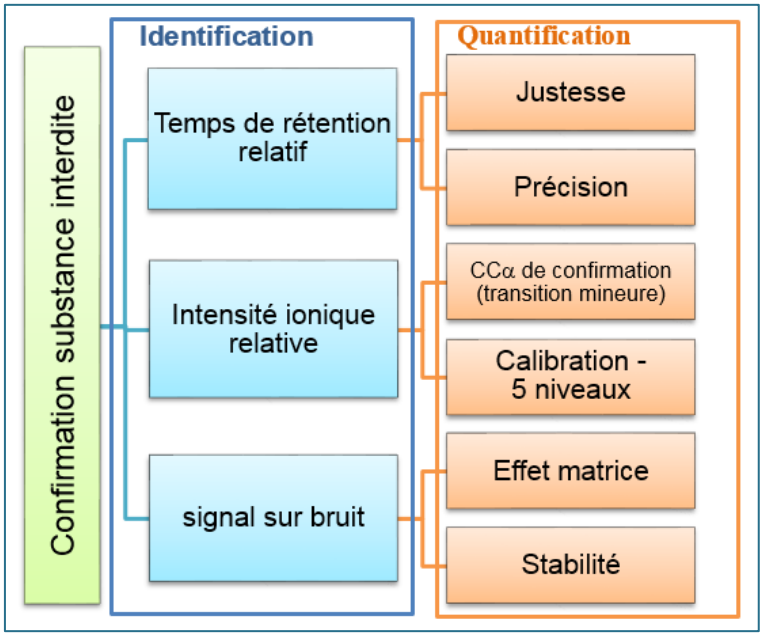


Figure 19 : Critères de performances à évaluer dans le cas de la validation d'une méthode de confirmation de résidus de substances interdites dans les denrées alimentaires.

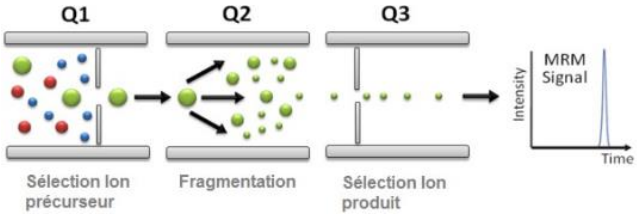
Dans notre étude, l'exercice de validation a été réalisé selon le Guide interne de l'Anses Fougères dédié aux méthodes analytiques de confirmation utilisant la LC-MS/MS. Il est basé sur la Décision de la Commission Européenne Européenne 2002/657/CE et sur la norme ISO 17025 :2017 (Commission Européenne,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

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

2.3.1 L'Identification primordiale des substances interdites

↳ Les Points d'identifications et transitions ioniques relatives

La Décision 2002/657/CE définit des exigences primordiales pour les méthodes de confirmation avec détection par spectrométrie de masse, en introduisant le concept de **points d'identification (IP)** et en définissant des critères pour les intensités ioniques. Au cours de l'analyse de confirmation, un nombre spécifique de IP doit être collecté. **Pour confirmer l'identité univoque des substances non autorisées, illégales, ou interdites** - communément appelées substances du groupe A - un minimum de **4 IP** est requis. Pour confirmer l'identité des substances vétérinaires autorisées répertoriées dans le groupe B, un minimum de 3 IP est requis. Le nombre d'IP gagnés par une analyse spécifique dépend de la technique utilisée et principalement de la spécificité des signaux générés par la technique analytique utilisée; Pour toutes ces raisons, la chromatographie couplée à la spectrométrie de masse est souvent préférée voire inévitable dans le cas des substances interdites. La confirmation de l'identité univoque des colorants est ainsi réalisée très souvent par LC-MS/MS, en détectant deux transitions dites MRM (Multiple Reaction Monitoring) par analyte. Elles sont nécessaires pour atteindre un haut degré d'identification. Cela se traduit par un nombre suffisant de IP, c'est-à-dire 5 IP pour la technique LC-MS/MS en référence au tableau 5 de la Décision 2002/657/CE. Ce nombre de IP devrait être inchangé dans la future règlementation SANTE-2018-11188. Lors de la sélection des transitions MRM, l'ion moléculaire (pseudo-moléculaire) doit être de préférence l'un des ions diagnostiques sélectionnés. Peuvent être retenus l'ion moléculaire, ses adduits caractéristiques, ses ions fragments caractéristiques et tous leurs isotopes).



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

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

↳ Les temps de rétention relatifs :

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

↳ Le Signal sur bruit (S/N) :

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

2.3.2 L'importance d'une quantification suffisamment exacte

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

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

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

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

↳ L'évaluation de la fidélité et de la justesse

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

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

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

Tableau 8 : Justesse minimale des méthodes quantitatives

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

↳ Le calcul des limites analytiques

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

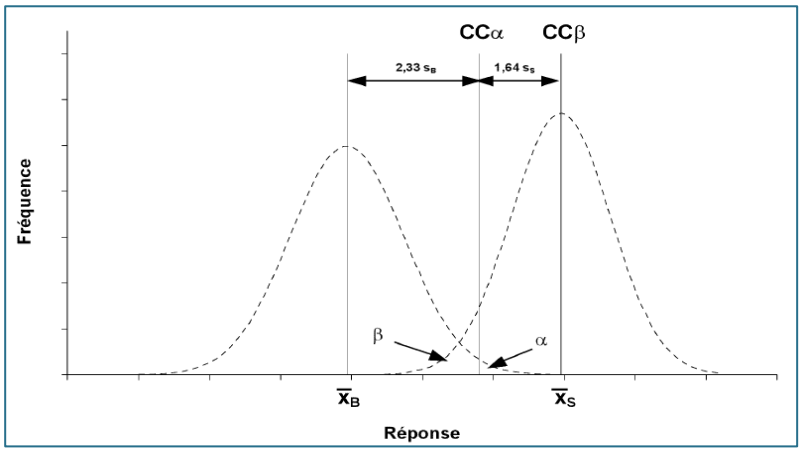


Figure 20 : Représentation graphique du CCα et du CCβ pour les substances non autorisées. Source : Décision 2002/657/CE

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

↳ Des effets matrice maitrisés

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

↳ La connaissance de la stabilité

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

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

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

3 Données d'occurrence associées des colorants dans les poissons d'élevage et perspectives de recherche

Les principes de la Loi Européenne sur l'alimentation (European Food Law), ainsi que ceux des règlements fixés aux Etats-Unis, au Canada ou encore au Japon, déterminent les principes fondamentaux de surveillance et de conditions d'importations, afin de préserver les ressources, notamment de produits de la mer, et de répondre aux fortes attentes des citoyens en matière de sécurité et de qualité de leurs aliments (Commission Européenne, 2020).

A ces fins, des **programmes de surveillance et d'inspection** des produits de la mer ont été mis en place dans le monde entier depuis plus de 20 ans afin de favoriser le libre-échange et les importations de façon fiable et sécuritaire. Ainsi, les organismes de réglementation et les administrations des pays importateurs sont responsables de l'inspection de la production nationale de poisson d'élevage et des produits aquacoles importés. La teneur en résidus de médicaments vétérinaires, mais aussi les contaminants tels que les métaux lourds, les polychlorobiphényles (PCB), les toxines et les agents pathogènes microbiens, de cette production et de ces importations est soigneusement contrôlée afin d'atténuer les expositions non intentionnelles chez l'homme, susceptibles de présenter des risques pour la santé.

Concernant les colorants, bien que le JECFA ait recommandé aux autorités compétentes du monde entier de ne pas les utiliser chez les animaux producteurs d'aliments, leur usage en aquaculture reste une réalité, probablement parce qu'ils sont toujours largement présents dans l'industrie textile et ailleurs, mais aussi encore disponibles dans le commerce de détail sous forme de produits chimiques thérapeutiques pour les poissons d'ornement. Dans ce cadre de recommandations et de Food Law, l'UE a exigé depuis les années 2000 que **ces substances soient activement contrôlées** dans les produits alimentaires destinés à la consommation humaine, et essentiellement ceux issus de l'élevage de poissons et de fruits de mer.

3.1 Une surveillance assurée au quotidien par les Plans Nationaux de Contrôle des Résidus (National Residue Monitoring Plans, NRMPs)

3.1.1 Obligations

Les pays membres de l'UE doivent mettre en œuvre des plans nationaux de surveillance et de contrôle des résidus chimiques chez les animaux producteurs d'aliments, en fonction de l'ampleur de leurs productions respectives ; et ce afin de détecter le mésusage de médicaments vétérinaires autorisés ou bien l'usage abusif et illégal de substances vétérinaires aujourd'hui interdites et de rechercher les raisons de la présence de ces résidus.

3.1.2 Importations hors UE

Les règles de l'UE affectent aussi ses partenaires commerciaux du monde entier. Les pays non membres de l'UE souhaitant exporter vers les pays de l'UE doivent garantir le même niveau de sécurité des denrées alimentaires et des aliments pour animaux que celui exigé dans l'UE. Aussi ces pays exportant vers l'UE doivent garantir la mise en œuvre d'un plan de surveillance des résidus de niveau équivalent.

3.1.3 Résultats des plans en 2015, 2016, 2017

Dans le cas des produits de l'aquaculture, un plan de surveillance des résidus, comprenant des analyses de résidus de médicaments vétérinaires, de pesticides, de métaux lourds et de contaminants environnementaux, doit être en place pour vérifier la conformité aux exigences de l'UE. Le plan et les résultats du suivi de l'année précédente doivent être soumis à la Commission Européenne chaque année pour approbation et la liste des pays avec les plans approuvés est répertoriée et révisée régulièrement. Si l'on extrait les données des trois derniers rapports publiés faisant état des résultats des plans (Commission Européenne, 2016-2018) demandés selon la Directive N° 96/23/CE pour le groupe B3e « Autres substances et contaminants environnementaux, colorants », les résultats des échantillons non conformes pour les résidus de colorants sont les suivants :

- En 2015, 43982 échantillons ont été analysés pour les substances du groupe B3 parmi lesquels **839 échantillons étaient non-conformes** (1.91 %). De même que pour le groupe B2, la fréquence des analyses pour certains sous-groupes B3 est très variable en fonction de la catégorie d'animaux et de produits. Alors que les contaminants chimiques (B3c) sont analysés dans toutes les catégories d'animaux et de produits, les colorants (B3e) ne sont analysés que dans les produits d'aquaculture, représentant un total de 1688 analyses spécifiques sur 27 états membres de l'UE concernés par l'élevage aquacole. Au total, 28 échantillons ont été signalés non-conformes (1.66 %) parmi les échantillons analysés pour les produits d'aquaculture. Les colorants retrouvés étaient principalement **MG, CV, et BG ainsi que leurs métabolites LMG, LCV.**
- En 2016, 36923 échantillons ont été analysés pour les substances du groupe B3 parmi lesquels **659 échantillons étaient non-conformes** (1.78 %). La prévalence en colorants (B3e) dans les échantillons de l'aquaculture (1.57 %) se trouvaient dans le même intervalle que les 9 années précédentes (1.14 %–2.2 %). Le nombre d'échantillons non-conformes sur les 1651 analyses spécifiques pour les colorants étaient de 26 (1.57 %). Les colorants retrouvés étaient **MG, et CV ainsi que leurs métabolites LMG et LCV**.
- En 2017, 40809 échantillons ont été analysés pour les substances du groupe B3 parmi lesquels **601 échantillons étaient non-conformes** (1.47 %). Les résidus de colorants (groupe B3e) ont été rapportés en aquaculture pour 28 échantillons non-conformes (1.79 %) sur les 1567 analyses pour ce groupe. Les colorants retrouvés étaient **MG, et CV ainsi que leurs métabolites LMG et LCV.**

3.2 Un système européen d'alerte rapide: RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed)

3.2.1 Inspection des produits de la pêche aux frontières de l'UE (Postes d'Inspection Frontaliers, PIFs)

Les importations de produits de la pêche en provenance de pays non membres de l'UE doivent entrer dans l'UE via un des nombreux postes d'inspection frontalière (PIF) agréé et placé sous l'autorité d'un vétérinaire officiel dans l'État membre de l'UE en question. Par conséquent, les contrôles des produits de la mer importés dans l'Union doivent être effectués par un PIF avant que les produits ne pénètrent sur le territoire européen. La fréquence et le type des contrôles physiques sont déterminés pour chaque catégorie de produits sur la base du risque intrinsèque et des résultats des contrôles effectués précédemment sur le même produit de même origine.

S'il s'avère que l'envoi est en non-conformité avec la législation de l'UE, pour une raison quelconque, les PIFs notifient alors la non-conformité à l'ensemble de leurs collègues de l'UE par le biais **du système de notification interne, RASFF**.

3.2.2 Les alertes RASFF

Le système d'alerte rapide pour les denrées alimentaires et les aliments pour animaux (RASFF) a été mis en place afin de fournir aux autorités de contrôle des denrées alimentaires et des aliments pour animaux, un outil efficace pour échanger des informations sur les mesures prises pour faire face aux risques graves détectés concernant les denrées alimentaires et les aliments pour animaux. Cet échange d'informations aide les pays de l'UE à agir plus rapidement et de manière coordonnée face à une menace pour la santé publique résultant de l'alimentation humaine ou animale. Les membres du RASFF ont chacun un point de contact national désigné qui est chargé de transférer les notifications du RASFF vers la Commission Européenne et les autres Etats Membres. Avant la notification d'alerte, tout un processus a été appliqué entre le laboratoire, l'autorité compétente et le point de contact national. Le détail des notifications d'alertes est répertorié dans un portail dédié (Commission Européenne, RASFF portal), où l'on peut trouver un ensemble de détails pour chaque dossier et les niveaux de risques associés à chaque alerte (risque élevé, faible, non décidé).

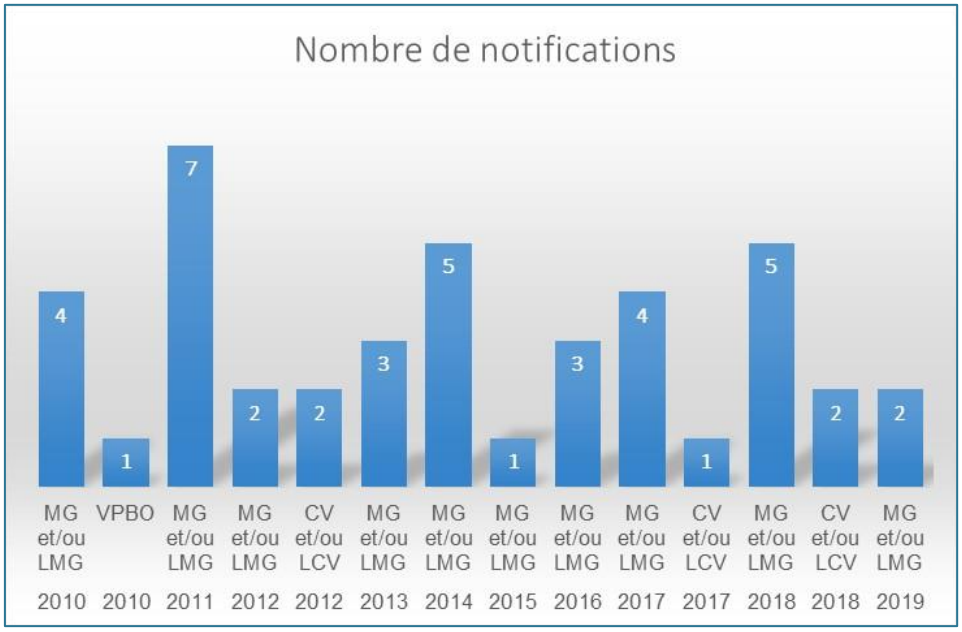


Figure 21 : Nombre d'alertes recensées en Europe pour les colorants dans les produits d'aquaculture extraites du portail EU RASFF entre 2010 et 2019

Pour les colorants, le nombre d'alertes recensées depuis 2010 et extraites du portail est représenté sur la **Figure 21** et ces alertes sont détaillées dans le **Tableau 9** (espèce, origine, quantité exprimée en concentration). Le nombre de notifications a oscillé entre 1 et 5, voire exceptionnellement 7 en 2011. Elles concernent d'abord le couple MG/LMG, puis CV/LCV, et enfin une seule alerte a concerné le VPBO en 2010. Environ la moitié des notifications ont ciblé des espèces provenant d'Asie du sud-est comme le poisson *Panga* du Vietnam. Les autres espèces aquacoles provenaient aussi d'Europe de l'Est comme la truite ou la carpe.

Tableau 9 : Notifications recensées en Europe pour les colorants dans les produits d'aquaculture extraites du portail EU RASFF entre 2010 et 2019

Année	Colorant	Espèce-origine	Quantité en ppb
2010	MG	Truite Allemagne	3.3
	LMG	Tilapia Chine	20
	LMG	Crevette Thaïlande	3.3
	MG	Poisson Panga Vietnam	/
	VPBO	Poisson Panga Vietnam	8.9
2011	MG+LMG	Poisson Chat Vietnam	1.6
	LMG	Gambas Inde	22.4
	LMG	Truite Pologne	1.08
	LMG	Truite Autriche	1.24
	LMG	Poisson Chat Vietnam	6.2
	LMG	Caviar Chine	4.39
	LMG	Œufs Truite Danemark	2.5
2012	LMG	Truite Allemagne	62.4
	LMG	Truite Turquie	3.48
	LCV	Poisson Chat Indonésie	/
	CV	Truite Slovaquie	3.75
2013	MG+LMG	Carpe Pologne	9.21-243.78
	MG	Poisson Chat Vietnam	9.21
	LMG	Truite Pologne	6.66
2014	MG+LMG	Red-tail Tinfoil Barb Vietnam	/
	MG	Poisson Goby Vietnam	6.26
	MG	Red-tail Tinfoil Barb Vietnam	4.6
	MG+LMG	Poisson Chat Vietnam	0.9
	LMG	Perche Vietnam	18.9
2015	LMG	Poisson congelé Vietnam	39
2016	LMG	Truite Danemark	4.96
	LMG	Truite Danemark	5.9
	MG+LMG	Crevette Bengladesh	1.6-0.91
2017	LMG	Carpe Lituanie	2.4
	LMG	Poisson Chat Vietnam	> MRPL
	LMG	Poisson Chat Vietnam	/
	MG	Poisson Chat Vietnam	29
	LCV	Truite Allemagne	6.2

2018	LMG	Poisson Chat Vietnam	40.44
	MG+LMG	Barramundi Vietnam	2-54
	LMG	Truite Allemagne	10
	LMG	Truite République Tchèque	7.73
	LMG	Carpe Biélorussie	0.42
	CV	Poisson Panga Vietnam	> CCα
	CV	Poisson Panga (peau) Vietnam	0.8
2019	LMG	Truite Italie	13.4
	LMG	Poisson Chat Vietnam	40.44

3.2.3 Les données d'études scientifiques confortent ces résultats

Les résultats annuels des NRMPs (1.5 % d'échantillons non-conformes) et des RASFF des 28 Etats Membres de l'UE démontrent que, malgré leur interdiction, les colorants, et surtout MG, restent utilisés frauduleusement. Cette occurrence pourrait être liée parfois à une cause environnementale (rejets d'industries par exemple). Il est à noter que les méthodes d'analyse en Europe ne couvrent pas tous les colorants dans leur périmètre, et que la recherche analytique presque centrée seulement sur MG pourrait biaisée les résultats. Mais CV, également recherché par certaines des méthodes d'analyse concernant les colorants (15 états membres le recherchent), serait beaucoup moins occurrent dans les produits aquacoles. Plusieurs études scientifiques (liste non exhaustive) sont recensées ci-dessous depuis 2010 (**Figure 22**), et corroborent ces résultats :

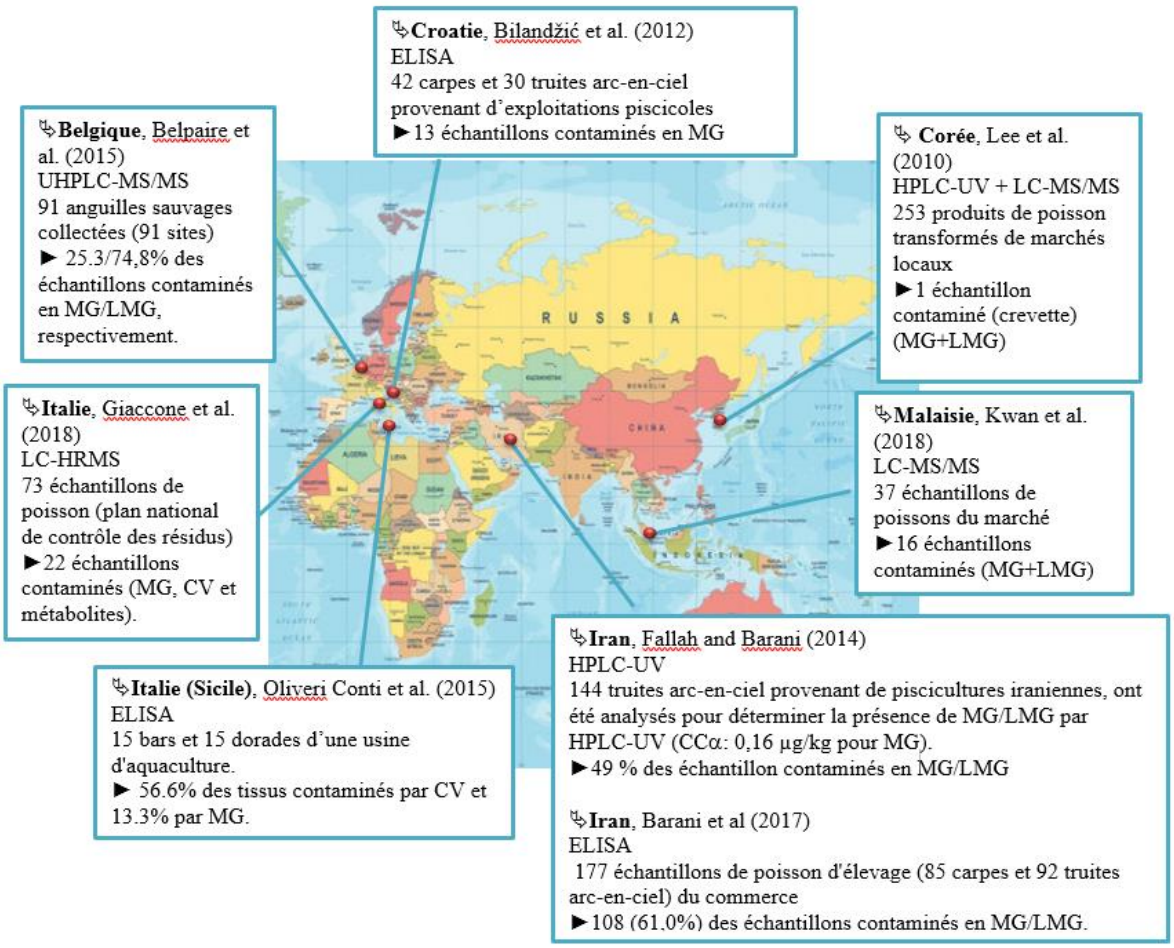


Figure 22 : Etudes scientifiques de recherche de colorants dans les produits d'aquaculture

- Lee et al. (Lee et al., 2010) ont présenté une analyse de 253 produits de poisson transformés provenant des marchés locaux en **Corée** (année d'échantillonnage non indiquée). Les échantillons ont été analysés par HPLC-UV (LOQ: 1,0 µg/kg) et les résultats positifs ont été confirmés par LC-MS/MS. Des résidus de MG/LMG ont été détectés dans un échantillon de crevette à une concentration de 2,6 µg/kg.
- Des échantillons de carpes (n = 42) et de truites arc-en-ciel (n = 30), prélevés entre 2009 et 2011 dans des exploitations piscicoles en **Croatie**, ont été analysés pour déterminer les résidus de MG, à l'aide d'un test ELISA spécifique à MG (CCβ: 0,68 µg/kg). MG a été détecté dans 13 échantillons, mais à des concentrations inférieures à la MRPL de 2 µg/kg (Bilandžić et al., 2012).
- Oliveri Conti et al. (Oliveri Conti et al., 2015) ont analysé des échantillons de bar (n = 15) et de dorade (n = 15) prélevés dans une usine d'aquaculture en **Italie** en 2013. Une méthode ELISA avec une LOD de 0,2 µg/kg a été utilisée. MG a été détecté à des concentrations allant jusqu'à 1,21 µg/kg et CV jusqu'à 3.79 µg/kg dans 13.3 % et 56.6 % des échantillons.

- Des échantillons d'anguilles européennes sauvages ont été collectés entre 2000 et 2009 en **Belgique** (n = 91 sites; 1 anguille / site) pour une étude d'occurrence environnementale. Les échantillons ont été analysés par UHPLC-MS/MS (LOD : 0,05 µg/kg). MG/LMG ont été détectés dans 25.3/74,8 % des échantillons, respectivement. Des concentrations allant jusqu'à 0,96/9.61 µg/kg ont été rapportées pour MG et LMG, respectivement (Belpaire et al., 2015).
- Des échantillons (n = 144) de truites arc-en-ciel, collectés en 2011 dans des pisciculturesiraniennes, ont été analysés pour déterminer la présence de MG/LMG par HPLC-UV (CCα: 0,16 µg/kg pour MG). Des résidus de MG (somme de MG + LMG) ont été détectés dans 49 % des échantillons à des concentrations comprises entre 0,3 et 146,1 µg/kg (Fallah and Barani, 2014). De nouveau, une étude plus récente de Barani et al (Barani and Tajik, 2017), a examiné la présence de résidus de MG dans 177 échantillons de poisson d'élevage (85 carpes et 92 truites arc-en-ciel) achetés dans le nord-ouest de l'**Iran** de 2014 à 2015. La méthode d'immuno-essai enzymatique (CCβ <1 µg/kg), a identifié la présence de MG dans 108 échantillons de poisson, ce qui correspond à 61,0 % du total des échantillons examinés, compris entre 0,35 et 7,12 µg/kg. Les résultats ont indiqué que l'utilisation de MG dans les pisciculturesiraniennes est fréquente.
- Des échantillons (n = 37) de divers poissons en **Malaisie** achetés sur 11 marchés différents, ont été analysés pour déterminer la présence de MG/LMG par LC-MS/MS. Les résultats ont montré que la somme des résidus de MG et de LMG dans la présente étude allait de 0,53 à 4,1 µg/kg et présents dans 16 échantillons sur 37 (42 %), le résidu le plus élevé étant détecté dans le poisson-chat domestique rayé (Kwan et al., 2018).
- Giaccone et al. (Giaccone et al., 2018) ont étudié la présence de MG, LMG, BG, CV et LCV par LC-HRMS dans la chair du poisson. Une limite de décision CCα comprise entre 0,55 et 0,62 µg/kg a été estimée. La méthode a été utilisée avec succès pour détecter les résidus de colorant dans 73 échantillons de poisson, comme prévu dans le plan national de contrôle des résidus. Soixante-treize échantillons, y compris de la truite et du bar, ont été achetés auprès de différents marchés et d'éleveurs en **Italie**. Vingt-deux de ces échantillons ont été trouvés contaminés par des colorants en quantité supérieure à CCα. La présence de MG et de CV dans tous les échantillons positifs a été mise en évidence, avec des concentrations plus faibles de leurs leuco métabolites.

3.2.4 Conclusions et perspectives de recherche

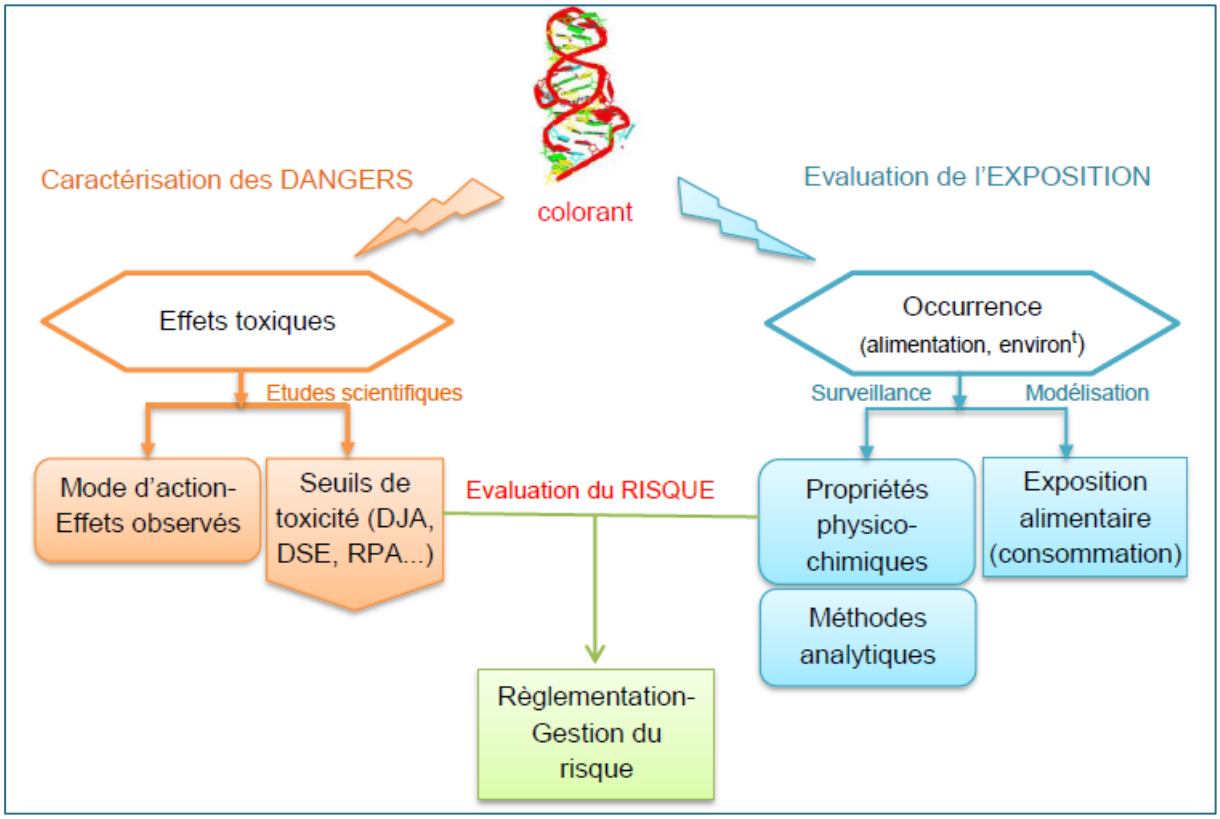


Figure 23 : Diagramme simplifié d'évaluation des risques pour une substance comme les colorants

L'objectif ultime d'une évaluation de risques est de s'assurer de la sécurité sanitaire. Elle permet de faire évoluer la règlementation en émettant des règles de gestion des risques (**Figure 23**). Cette évaluation se prépare en associant la caractérisation des dangers à l'évaluation de l'exposition. Le paradigme d'analyse des risques a d'ailleurs été défini par le Codex Alimentarius comme un procédé comportant trois composantes : l'évaluation du risque, la gestion du risque et la communication du risque. Dans l'analyse des risques, la séparation fonctionnelle entre les évaluateurs et les gestionnaires des risques est décrite comme essentielle pour assurer l'objectivité scientifique du processus d'évaluation des risques.

Nous nous sommes axés dans cette thèse sur des travaux méthodologiques, visant à rechercher des résidus marqueurs endogènes et exogènes de poissons contaminés par les colorants. Comme nous l'avons vu dans cette synthèse bibliographique, la **caractérisation des dangers** issus de l'utilisation des colorants en aquaculture est relativement bien décrite. La toxicité, les modes d'action et les seuils de toxicité ont fait l'objet de nombreuses études, surtout pour MG et CV, mais des rapprochements entre structures sont souvent réalisés pour les autres colorants. Ainsi certaines études éparses, sur les substances de la famille des Victoria par exemple, démontrent

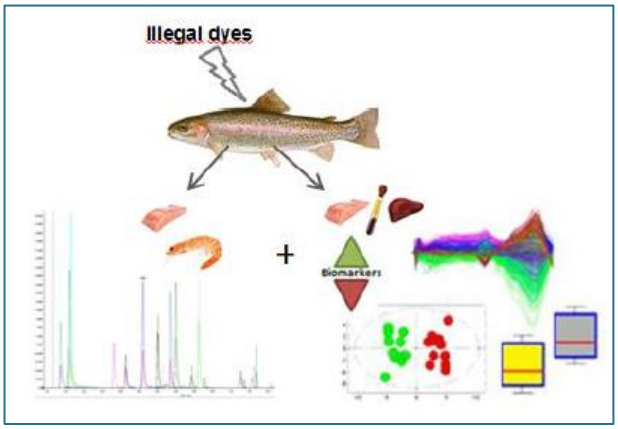
que d'autres colorants structuralement proches s'avèrent également être des dangers potentiels. Dans le rapport de l'EFSA sur MG (EFSA et al., 2017a), les experts ont rappelé que :

- Des données concernant la présence de métabolites supplémentaires dans les poissons et les crustacés devraient être générées.
- Des informations supplémentaires sur le devenir de MG et de LMG au cours de la transformation des aliments devraient être obtenues.
- Les connaissances concernant la toxicocinétique et la biodisponibilité de MG / LMG chez l'homme par des modèles *in vitro* devraient être renforcées.
- Les informations concernant la génotoxicité potentielle des métabolites N-déméthylés devraient être développé.
- Les adduits de l'ADN et du GSH observés chez les rongeurs doivent être caractérisés.

Ces conclusions démontrent que, même pour MG qui est le colorant le mieux caractérisé à ce jour, des données complémentaires seraient nécessaires pour renforcer l'évaluation de risque. Il serait intéressant en particulier de renforcer les connaissances sur l'occurrence de métabolites et leur toxicité dans les produits contaminés. Malgré un contrôle important déployé dans le monde entier au cours des 15 dernières années, MG est toujours utilisé comme le montrent les données d'occurrence. MG reste donc l'un des premiers problèmes à résoudre en matière de contrôle des résidus de colorants en aquaculture dans le monde, mais il est également nécessaire d'anticiper sur les pratiques en élevage et par conséquent sur les méthodes analytiques permettant leur contrôle.

D'une part, la contamination d'un lot de poisson par le VPBO qui démontre une adaptation des pratiques interdites en réponse à la réglementation, d'autre part les métabolites des colorants qui ne sont pas assez pris en compte dans l'évaluation des risques, et enfin l'idée que l'expansion de l'aquaculture doit pouvoir répondre à la demande mondiale en protéines, sont trois aspects d'une problématique commune à laquelle nous devrions répondre. Après avoir traité les points sur les caractéristiques physico-chimiques des colorants et de leurs résidus, leur surveillance réglementaire dans les denrées alimentaires et leur occurrence en terme d'exposition en aquaculture, le chapitre bibliographique suivant traitera de l'intérêt des études de métabolisme pour orienter les méthodes analytiques du futur en vue de répondre à une caractérisation plus précise des dangers auxquels les consommateurs sont exposés.

4 La métabolomique comme outil pour l'évolution des méthodes d'analyses : recherche de biomarqueurs de traitement



Ces 20 dernières années, le besoin d'analyses rapides, sensibles, et précises des molécules telles que les médicaments et leurs métabolites dans les matrices biologiques complexes ont conduit à une amélioration continue des technologies de séparation et de détection physico-chimique de type CL/SM. La science du métabolisme et la spectrométrie de masse ont été combiné de façon avec succès pour l'étude du vivant et cela grâce à la mise au point d'instruments analytiques modernes extrêmement sensibles, à la disponibilité de bases de données sur les métabolites et aux progrès de la (bio)-informatique (Want et al., 2007).

En analyse physico-chimique pour la surveillance des contaminants et médicaments vétérinaires, les substances et métabolites d'intérêt correspondants ont d'abord été suivis dans les matrices biologiques à l'aide de méthodologies simples et ciblées. Cependant, dans certains cas, ces approches ciblées ne permettaient pas la détection de certains composés, comme par exemple de nouvelles substances anabolisantes interdites issues de l'émergence de nouvelles pratiques en élevage (Gallart-Ayala et al., 2015). Les scientifiques ont ainsi progressivement pu ouvrir les yeux afin de scruter les êtres vivants, les problématiques, les processus, les mécanismes d'action. Cette nouvelle logique initiée en génomique a contribué au développement de nouvelles approches OMICS, qui incluent la **métabolomique**. Cette ouverture sur l'ensemble des métabolites fabriqués par un système vivant a pu se réaliser grâce à l'apparition et au développement des technologies non-ciblées, qui ont su contribuer positivement au domaine de la sécurité des aliments.

4.1 Le métabolome, définition et principe

Dans son rapport « Using 21st Century Science to Improve Risk-Related Evaluations", l'académie des sciences a défini la métabolomique comme étant : « *L'étude scientifique des petites molécules (métabolites) de produits chimiques originaires d'un système biologique vivant (de manière endogène) ou extérieur à ce système biologique (de manière exogène)* » (National Academies of Sciences and Medicine, 2017). Elle est représentée dans la dernière étape de la cascade « omics » (**Figure 24**) faisant suite aux modifications expressionnelles génomiques et transcriptomiques (expression des gènes et leur régulation), puis protéomiques (analyse des protéines générées suite à la régulation génique).

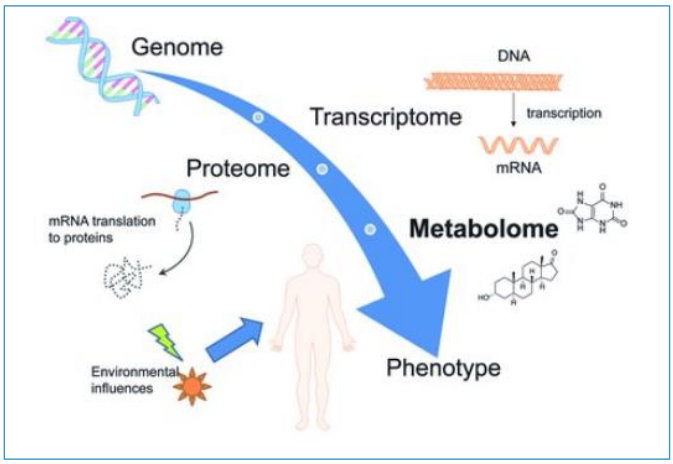


Figure 24 : Représentation schématique des différentes sciences « omics ». Source: (Steuer et al., 2019)

Le terme **métabolome** est apparu pour la première fois dans une étude de séquençage du génome de la levure en 1998 (Oliver et al., 1998). Plus précisément, le métabolome représente l'ensemble des substances métaboliques de faible poids moléculaire (<1 kDa) contenues dans un système biologique tels que des cellules, des fluides biologiques (urine, plasma et sang), les tissus ou encore les organismes vivants. Ces métabolites interagissent au sein du système biologique étudié dans des conditions génétiques, nutritionnelles et environnementales données. Ils peuvent être classés selon leur origine, endogène ou exogène à l'organisme (Want et al., 2007). À cet égard, la métabolomique est une source exceptionnelle de découverte de biomarqueurs, qui présente des avantages par rapport aux autres approches omiques (Ryan and Robards, 2006).

↳ L'endo-métabolome

Parmi les métabolites endogènes, représentant l'**endo-métabolome**, on distingue les métabolites primaires, directement impliqués dans les processus indispensables au développement normal et à la reproduction des cellules, et les métabolites secondaires qui sont spécifiques aux plantes. Ces métabolites appartiennent à différentes familles chimiques telles que les acides aminés, les acides carboxyliques, les alcools, les antioxydants, les nucléotides, les polyols ou encore des vitamines.

↳ Le xéno-métabolome

Le concept de xéno-métabolome a été définit au début des années 2000 comme étant « la description multivariée du profil du métabolite xénobiotique (composé étranger) d'un individu ou d'un échantillon provenant d'un individu qui a été exposé par différentes voies possibles (délibérément ou accidentellement) à des médicaments, des polluants environnementaux ou des composants alimentaires qui ne peuvent pas être complètement catabolisés par des systèmes enzymatiques métaboliques endogènes » (Holmes et al, 2007).

↳ La métabolomique en sécurité des aliments

La métabolomique s'applique à des domaines variés, comme la médecine personnalisée en chimie clinique (Mayr, 2008), la pharmacologie, la toxicologie, afin de relier une **exposition chimique** (mesure des substances chimiques parentes ou de leurs produits directs de biotransformation/dégradation) à un **effet biologique** (mesure de biomarqueurs indirects dont le niveau d'expression est sur- ou sous-exprimé consécutivement à cette exposition).

L'application de la métabolomique dans les systèmes alimentaires est appelée «**métabolomique alimentaire**», représentée schématiquement sur la **Figure 25**. Elle peut s'appliquer à tous les processus des systèmes alimentaires (Josić et al., 2017), de la ferme à l'homme, y compris la production de ressources alimentaires, la transformation industrielle de produits alimentaires et la consommation alimentaire par l'homme (Kim et al., 2016).

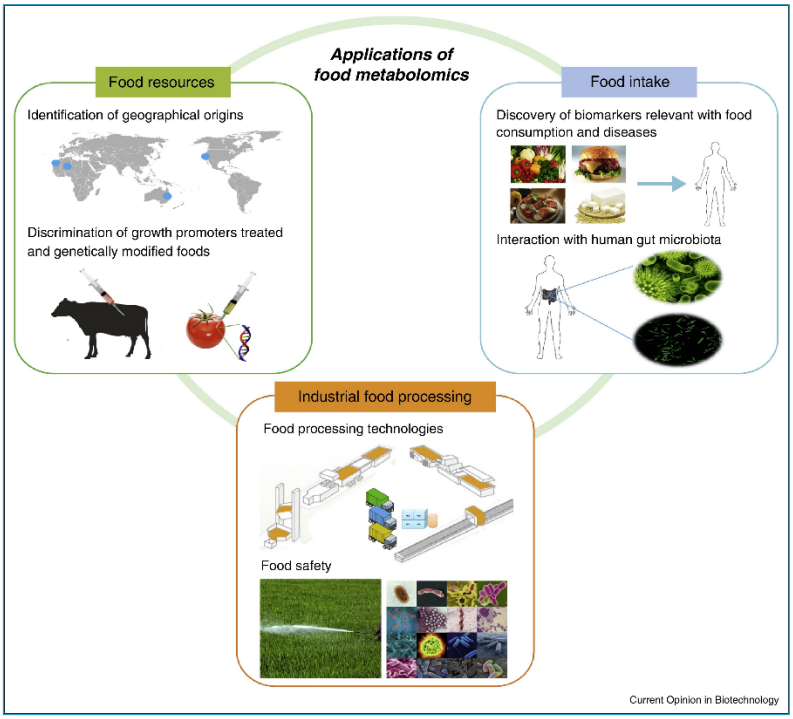


Figure 25 : Les trois principales applications de la métabolomique alimentaire, de la ferme à l'homme: la production de ressources alimentaires, la transformation industrielle des aliments et la consommation alimentaire par l'homme. Source : (Kim et al., 2016)

Le métabolome alimentaire est défini comme la partie du métabolome humain directement issue de la digestion et de la biotransformation des aliments et de leurs constituants. Ces aliments peuvent ainsi être modifiés par l'ingestion de contaminants et/ou **contenir leurs résidus comme ceux issus de médicaments administrés en production animale,** et sont donc évalués et contrôlés afin de s'assurer qu'ils ne présentent pas de dangers pour les consommateurs (sécurité sanitaire des aliments).

↳ La métabolomique en sécurité chimique des aliments d'origine animale

Les applications de la métabolomique en sécurité chimique des aliments se diversifient de plus en plus, afin d'observer les perturbations physiologiques induites, notamment pour les applications liées à la détection d'utilisations illicites de facteurs de croissances à faibles concentrations ou en mélanges pour l'élevage d'animaux (bêta-agonistes, stéroïdes, thyréostatiques) ou à la présence de contaminants (dioxine, HAP, PCB…). Le **Tableau 10** recense les applications en sécurité chimique des aliments d'origine animale et certaines applications d'éco-toxicologie chez le poisson.

Tableau 10 : Etudes métabolomiques réalisées en LC-HRMS dans le domaine de sécurité chimique des aliments d'origine animale.

Molécule	**Espèce**	**Matrice**	**Instrumentation**	**Référence**
Elevage				
Cocktail stéroides	bovin	urine	LC-Orbitrap-MS, XCMS UPLC-ToF-MS, MetAlign	(Dervilly-Pinel et al., 2011)
amoxicillin, cephapirin, ceftiofur	poulet	muscle	LC-Q-TOF-MS	(Hermo et al., 2013)
cimaterol, zilpaterol, ractopamine, clenbuterol, mabuterol	bovin	urine	LC-Orbitrap-MS	(Dervilly-Pinel et al., 2015)
Revalor-XS® trenbolone acetate- estradiol	bovin	sérum	LC-Orbitrap-MS	(Kouassi Nzoughet et al., 2015)
Clenbuterol, salbutamol, ractopamine	porc	urine	LC-Q-TOF-MS	(Wu et al., 2015)
Enrofloxacine	bovin	lait	LC-Orbitrap-MS	(Junza et al., 2016)
Ractopanime	porc	sérum	LC-Orbitrap-MS	(Peng et al., 2017)
Boldénone + cocktail stéroïdes	bovin	urine	LC-Orbitrap-MS	(Kaabia et al., 2018)
Cefquinome *Ceftiofur*	Poule pondeuse	oeuf foie fiente	LC-Orbitrap-MS	(Gaugain et al., 2019)
Poisson (éco-toxicologie/sécurité des aliments)				
Bisphénol A	*Méné à tête de boule*	Mucus de la peau	LC-MS/MS	(Ekman et al., 2015)
Contaminants chimiques, de rejets d'effluents après traitement des eaux usées	*Gardon*	Plasma, gonades, rein, branchies, foie	nUHPLC-nESI-TOFMS	(David et al., 2017)
UV filter oxybenzone	Daurade juvénile	Cerveau, foie, plasma	UHPLC-Orbitrap-MS	(Ziarrusta et al., 2018)
Rivière associée au développement des sables bitumineux	Meunier noir	muscle	LC-MS/MS	(Roszkowska et al., 2019)

Chez le poisson, la métabolomique est très utile pour étudier la qualité de la chair en fonction du type d'alimentation administrée en aquaculture (Guan et al., 2018; Parsons et al., 2018; Zhao et al., 2018), ou encore pour étudier les effets de la consommation de poissons sur notre métabolisme (Rodrigues et al., 2018; Serra-Majem et al., 2019; Shi et al., 2019). Capello et al ont par exemple évalué les risques de consommation de thon rouge de l'Atlantique au regard de la sécurité des aliments mise en doute à cause des niveaux d'accumulation en PCBs et en pesticides organochlorés au niveau hépatique. Ils ont appliqué une approche métabolomique basée sur la technique de ^{1}H-RMN (Cappello et al., 2018). Les études d'éco-toxicologie utilisant la métabolomique et mises en œuvre chez le poisson (**Tableau 10**), souvent réalisées par profilage, permettent d'étudier l'impact des polluants sur leur organisme et peuvent de ce fait être corrélées avec les questions de sécurité des aliments dans le sens où l'homme sera le dernier maillon de la chaine alimentaire.

↳ Les différents types d'approches en métabolomique

Dans ce domaine spécifique de la sécurité chimique des aliments étudié par des approches métabolomiques, une des difficultés repose sur la génération d'un grand nombre de signaux qui doivent refléter soit la présence éventuelle de résidus chimiques exogènes, dans notre étude ils sont issus d'un traitement d'une molécule de colorant interdite, soit la présence de métabolites transformés par les processus d'absorption, de distribution, de régulation et de métabolisme cellulaire. Ainsi, l'acquisition des signaux générés permet d'établir un lien entre les différences de fonctionnement biologique observées à l'état normal et à l'état perturbé. Apparait alors une variation du taux de certains métabolites, qui seront sous-exprimés ou sur-exprimés. Cet ensemble de variations significatives devient représentatif d'un traitement s'il s'avère être suffisamment prédictif. Le ou les métabolites retenus peuvent alors accéder au statut de « **biomarqueur** » capable de dépister un traitement. Les **biomarqueurs d'exposition (cause) et d'effet** ont fait l'objet d'une définition précise par l'OMS (World Health and International Programme on Chemical, 1993). Ils traduisent les étapes successives allant 1/ d'une exposition à une dose interne, 2/ d'une dose interne à une dose biologiquement efficace (biomarqueur d'exposition = cause), et 3/ d'un effet biologique précoce à l'altération d'une structure ou d'une fonction (biomarqueurs d'effets). Un des principaux avantages de la métabolomique est donc d'appréhender les perturbations biologiques liées à une exposition chimique, alors que les modifications du génome et du protéome sont souvent très faibles et indétectables.

Aujourd'hui, le choix des techniques analytiques d'exploration du métabolome couvre deux stratégies, reposant sur le stade auquel l'identification des métabolites est effectuée (Dunn and Ellis, 2005), à savoir « (i) **le profilage** » et « (ii) **l'approche non ciblée ou globale** » :

(i) En profilage, l'approche est ciblée, ou peut être également non ciblée si l'identité des métabolites n'est pas connue. L'idée est de suivre des métabolites spécifiques (exogènes) ou des perturbations le long d'une voie métabolique (endogènes). En mode ciblé, l'identification formelle des molécules permet d'utiliser un standard connu afin d'accéder à une quantification.

(ii) La détermination d'empreinte métabolomique (approche non ciblée) examine l'instantané global de l'ensemble des métabolites présents dans l'échantillon sans nécessité d'identification ou de quantification, pour des échantillons présentant différentes conditions biologiques (ex : échantillons traités et échantillons témoins) ; elle est alors généralement suivie de l'application de méthodes statistiques pour tenter d'identifier les métabolites présentant des différences significatives de niveaux de concentration entre les échantillons étudiés. Cette approche a été appliquée à une large variété de matrices biologiques comme l'urine, le plasma, la salive, les milieux cellulaires.

Nous verrons, dans le chapitre suivant, que des méthodologies pluridisciplinaires et bien précises sont mises en œuvre lors de ces approches, notamment pour ce qui concerne les outils d'analyse chimique et chimiométrique, pour la recherche de métabolites endogènes et exogènes. Dans le cadre de cette étude sur les colorants, les deux approches ont été appliquées, une approche globale et une approche de profilage en partie ciblée.

4.2 La métabolomique non ciblée pour l'étude de l'endo-métabolome

Une approche métabolomique non-ciblée ou globale comprend plusieurs étapes avec pour but d'étudier la variabilité entre des groupes d'animaux traités et des groupes d'animaux non traités, dans notre cas des poissons. Plus la variabilité liée au processus de traitement des poissons sera maitrisée et plus les variations biologiques seront visibles et permettront de distinguer de potentiels marqueurs pertinents. L'acquisition des empreintes chimiques en HRMS fournira un ensemble de données qui seront retraitées et exploitées au moyen d'outils d'analyses statistiques dans le but d'observer ces différences.

Les étapes principales de cette approche, schématisées ci-dessous (**Figure 26**) sont : la préparation des échantillons, la production et l'acquisition des signaux (données brutes), le traitement des données générées incluant leur annotation et éventuellement l'identification des métabolites ou biomarqueurs, et enfin si nécessaire l'interprétation biologique des biomarqueurs identifiés.

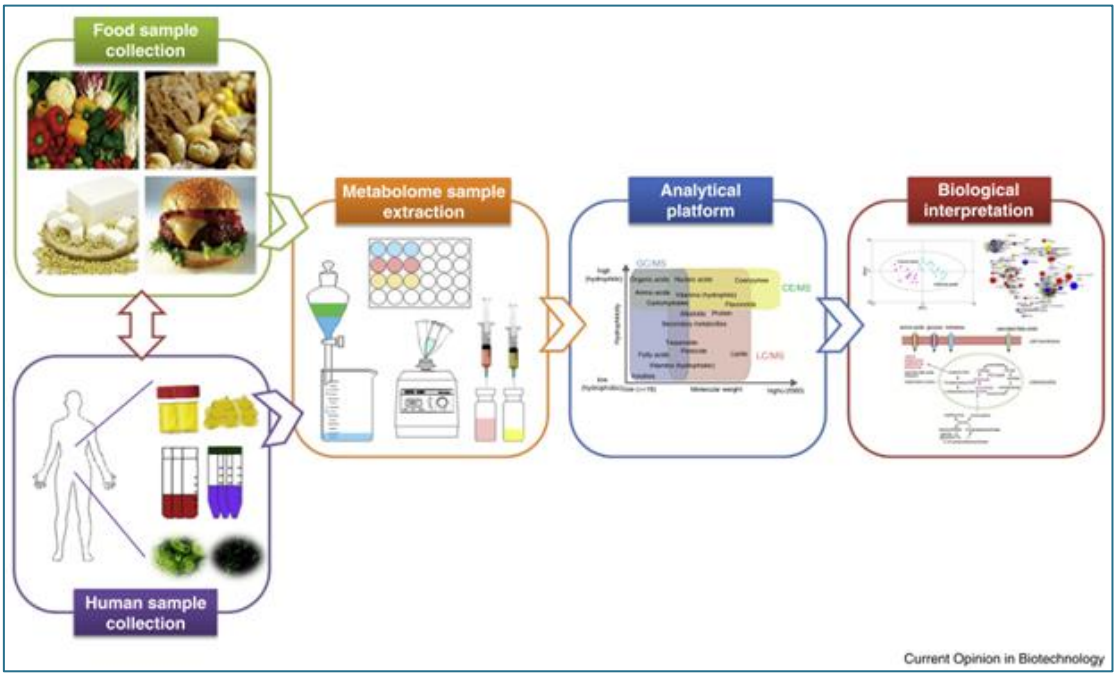


Figure 26 : Le workflow de la métabolomique alimentaire. Il comprend la collecte d'échantillons alimentaires et humains, l'extraction d'échantillons de métabolomes, l'analyse instrumentale à l'aide d'outils analytiques et l'analyse statistique de données métaboliques et leur interprétation biologique. Source : (Kim et al., 2016).

4.2.1 Workflow pré-analytique

↳ Collecte des échantillons

Avant de se lancer dans une analyse métabolomique, le choix du plan expérimental de la phase animale est primordial, afin de répondre à la question biologique souhaitée, qui est dans notre cas de repérer des différences biologiques entre des poissons traités aux colorants et des poissons non traités. Ce design est nécessaire pour garantir que même les plus petites variations biologiquement pertinentes du métabolome puissent être mesurées avec précision et que ces variations soient significativement plus importantes que les modifications ou perturbations introduites lors de la réalisation de l'étude (Gika et al., 2016). La qualité des données générées à partir d'une expérience de profilage est donc un résultat direct de la **qualité du plan expérimental** (Engskog et al., 2016).

Pour exemple concernant les poissons d'élevage, les paramètres physico-chimiques des bassins doivent être parfaitement maitrisés et suivis, tels que la température de l'eau, le pH, le taux d'oxygène, l'absence de nitrates, le flux d'eau ; ainsi que les caractéristiques physiques des poissons tels que l'espèce et l'origine, le sexe, la taille, leur nourriture (Danion et al., 2012).

Ensuite, la réflexion se porte sur **la nature des échantillons biologiques** qui seront appropriés à l'étude, de même que l'attention portée aux prélèvement et au stockage est primordiale. Les tissus, les biofluides (sang, urine, fèces, liquide séminal, salive, bile, liquide céphalo-rachidien) et la culture cellulaire sont souvent cités et notamment l'urine et le plasma comme fluides biologiques couramment utilisés, car ils sont relativement faciles à obtenir et sont collectés de manière relativement non invasive. Les fèces, sont également souvent prélevés chez les animaux, comme chez les bovins par exemple, à condition de trouver des conditions d'extraction adaptées (Cesbron et al., 2017). Les échantillons moins courants à étudier comprennent le liquide céphalo-rachidien, la salive et le sperme, ainsi que divers échantillons de tissus. Les échantillons de tissus, à la différence des fluides biologiques, peuvent être utilisés pour quantifier les empreintes métaboliques spécifiques à un organe, ce qui permet d'étudier les origines des métabolites. Ils reflètent souvent mieux les changements métaboliques au sein de l'hôte. Ces échantillons présentent par contre l'inconvénient de devoir sacrifier les animaux, nécessitant alors une optimisation économe du nombre d'animaux pour l'expérimentation (Stella et al., 2017).

Chez les poissons, les branchies (Wen et al., 2018) et le mucus (Reverter et al., 2017) sont des matrices atypiques apportant des informations d'intérêt. Un échantillonnage soigneux, la préparation et la gestion des échantillons comme le stockage (souvent réalisé à -80°C), sont essentiels pour une analyse optimale.

↳ Extraction

L'étape d'extraction consiste à préparer les échantillons de la façon la plus simple possible en vue de limiter toute source de variabilité externe et surtout récupérer un maximum d'information. Cette étape dépend de plusieurs aspects tels que la nature de l'échantillon et l'approche envisagée. Les différents tissus retenus pour l'étude doivent être d'abord prélevés de façon à éviter les inter-contaminations. Par exemple, dans le cas du poisson, le prélèvement de sang peut conduire à une contamination de la peau.

Ensuite, différentes méthodes d'extraction sont utilisées pour optimiser la récupération des composés de caractéristiques physico-chimiques variées et qui diffèrent aussi bien au niveau de

leur taille, de la nature de leurs groupements fonctionnels, de leur volatilité, de leur polarité ou encore de leurs concentrations physiologiques. A ce jour, il n'existe donc pas de méthode analytique universelle, capable de s'intéresser à l'ensemble de ces molécules. Ces stratégies de pré-traitement plus ou moins ciblées peuvent inclure : ultrafiltration, précipitation des protéines, extraction par partage liquide-liquide, extraction par SPE, dérivation chimique, et évaporation suivie de la reconstitution en solution dans un solvant ou mélange de solvants approprié pour l'analyse. Pour les études métabolomiques non ciblées, l'échantillon biologique subit généralement un prétraitement minimal afin de prévenir la perte potentielle de métabolites. Les étapes de pré-traitement des échantillons peuvent être assez simples, séparant par exemple les composés de faible poids moléculaire des protéines et/ou des lipides en utilisant des techniques d'élimination de ces derniers. Des mélanges de solvants de polarité différentes, méthanol et acétonitrile pour les métabolites polaires, ou dichlorométhane et chloroforme pour les métabolites apolaires sont souvent utilisés. Par exemple, Fu et al ont utilisé un mélange acétonitrile:isopropanol:eau (3:3:2, v/v/v) pour extraire des composés endogènes chez des embryons de zebrafish à la suite d'un traitement au triclosan, et ont réussi à identifier 8 métabolites significativement altérés (urée, acide citrique, D-(+)-galactose, D-glucose, acide stéarique, L-proline, phénylalanine, acide L-glutamic) (Fu et al., 2019). Pour l'extraction de métabolites dans les biofluides, on utilise donc souvent des méthodes de prétraitement non sélectives, telles que la technique « dilute and shoot » et la précipitation de protéines par solvant, dans la mesure où elles permettent une couverture étendue des métabolites et des analyses à haut débit (Vuckovic, 2012; Raterink et al., 2014).

↳ Génération de données par LC-HRMS

Le choix de la méthode la plus appropriée pour la production des données en métabolomique va dépendre des molécules étudiées, des voies métaboliques d'intérêt, du matériel disponible et doit reposer sur un compromis entre la robustesse, la sélectivité et la sensibilité instrumentale (**Figure 27**), en particulier pour la recherche de composés exogènes qui parfois se trouvent masqués par le signal prépondérant de composés endogènes.

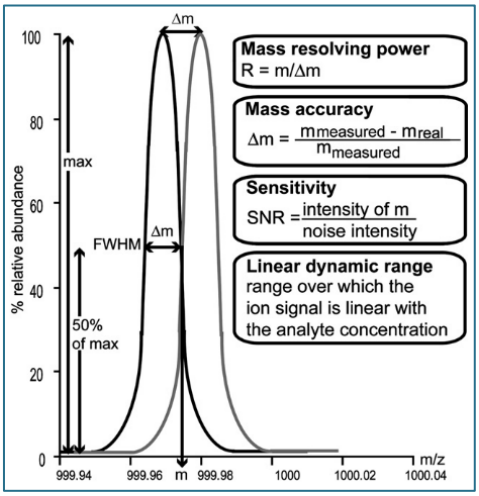


Figure 27 : Paramètres utilisés pour décrire les performances d'un système de spectrométrie de masse. Source :(Moco et al., 2007).

Les techniques de séparation chromatographique couplées à la spectrométrie de masse, notamment la LC-MS, la GC-MS, se sont révélées très utiles pour générer des données de métabolomique. Mais les métabolites doivent alors généralement être séparés du liquide biologique avant leur détection par le spectromètre, ce qui rend ces méthodes plus lentes et plus complexes que par exemple la spectroscopie par RMN. Cependant, elles offrent une sensibilité beaucoup plus élevée et permettent donc de mesurer quantitativement un plus large spectre de métabolites (Miggiels et al., 2019).

Tableau 11: Récapitulatif des performances (résolution, exactitude en masse) des différents analyseurs de spectrométrie de masse.

Analyseur	**Résolution FWHM (m/z 400) De l'ordre de :**	**Exactitude en masse (ppm)**
Quadripôle	3000	200
Piège à ions (2D/3D)	5000	200
Temps de vol	8000-60000	2-10[a]
Orbitrap	100 000	<3
Résonance cyclotronique (FT-ICR)	10 000 000[b]	<1

[a] En utilisant un calibrant interne ; [b] Selon la puissance du champ magnétique

Concernant la partie séparation chromatographique, la génération de chaines de type UHPLC ces 15 dernières années a participé au développement des recherches en métabolomique, par une séparation des métabolites améliorée, une diminution du phénomène de suppression d'ion, un signal sur bruit et une capacité résolutive des pics accrue, et un temps d'analyse plus court (Want et al., 2007). La tendance actuelle à la miniaturisation des techniques de séparation tend

à aller vers des débits encore plus réduits, compatibles avec des sources spectrométriques de type microspray et nanospray ou même de remplacer la séparation chromatographique par des techniques d'introduction directe dans la source permettant d'accroitre l'efficacité d'ionisation des sources électropsray (ESI). En termes d'analyseurs à haute résolution HRMS, il existe de grandes variations de performances dans l'instrumentation entre les analyseurs à temps de vol (TOF) et les spectromètres de masse à transformée de Fourier (FTMS) basés sur des analyseurs de masse à trappe orbitale (Hardman and Makarov, 2003; Hu et al., 2005) ou à résonance cyclotronique ionique (ICR) (**Tableau 11**). Rathalao-Paris et al détaillent le panel d'instruments HRMS (pouvoir de résolution en masse supérieur à 10 000) utilisés en métabolomique en particulier pour leur avantage dans l'identification structurale des métabolites (Rathahao-Paris et al., 2016). La technologie Orbitrap™, utilisée dans le cadre de cette thèse, présente de multiples avantages (Senyuva et al., 2015; Ghaste et al., 2016):

- Une résolution de masse élevée avec la possibilité de discriminer les métabolites avec une erreur de masse de l'ordre de 1 à 3 ppm, ce qui permet d'analyser un extrait métabolique complexe et de minimiser également l'ambiguïté des attributions de formules moléculaires.
- Une flexibilité dans le choix de la source d'ions ou de la technique de fragmentation.
- Une capacité à effectuer plusieurs étapes de fragmentation (MSn), utile pour une caractérisation accrue des métabolites de composés inconnus.

Les données brutes, par exemple acquises avec un LC-HRMS-Orbitrap, vont consister pour chaque échantillon en une série de pics caractérisés chacun par un **couple m/z-TR avec une intensité donnée** (représentation 3D). L'étape d'extraction des signaux est déterminante pour la suite de l'analyse des données. Elle va permettre de générer une base de données brutes à épurer en fonction du bruit de fond, d'artefacts et de la redondance dans les données. C'est pourquoi, la constitution de la série d'injections, c'est-à-dire l'ordre dans lequel les échantillons seront injectés, constitue également un paramètre à maitriser. Ces échantillons devront être injectés de façon aléatoire (López-Ruiz et al., 2019), en intercalant des contrôle qualités (QC) nécessaires pour ré-aligner les pics chromatographiques dérivant légèrement en temps de rétention (TR), mais aussi en rapport masse-sur-charge (*m/z*).

4.2.2 Analyse et traitement de données

La quantité et la complexité des données produites par une seule expérience de métabolomique, notamment par l'acquisition en Full scan (balayage complet) de spectres MS, nécessitent des outils automatisés pour le prétraitement, l'analyse statistique et l'extraction d'informations biologiques utiles. C'est d'ailleurs aussi pour ces raisons de « Big Data » générées que le plan d'expérience (nombre d'animaux, conditions expérimentales, prélèvements …) doit être optimisé. Lors de cette étude, une plate-forme dédiée regroupant un ensemble d'outils statistiques et chimiométriques pour chaque étape du traitement des données a été utilisée. Il s'agit de la plate-forme Galaxy « Workflow4metabolomics » (Giacomoni et al., 2015) et du package XCMS du logiciel RStudio. Les données brutes sont alors décomposées et traitées (les dimensions «m/z», «intensité» et «temps de rétention», le cas échéant, sont combinées pour produire ce que l'on appelle des « features » ou caractéristiques). Ces logiciels disposent d'algorithmes mathématiques permettant d'assurer ces étapes de pré-traitement des données par une détection automatique et un alignement des signaux. Une fois ces données éclaircies, le pré-traitement est ensuite suivi du traitement statistique des données. La recherche de signaux discriminants est réalisée en comparant les empreintes des échantillons regroupés en clusters pour mettre en évidence leurs similarités ou leurs différences. Un modèle statistique est construit en appliquant un traitement de données non supervisé (ACP) et/ou supervisé (PLS). La méthodologie est longue à détailler de façon exhaustive, et comme les modèles statistiques n'ont pas été appliqués personnellement (excepté le tri des « features » ou caractéristiques, et l'annotation des signaux), elle sera simplement schématisée et résumée ci-dessous (Castillo et al., 2011; Antonelli et al., 2019; Chaleckis et al., 2019) (**Figure 28**).

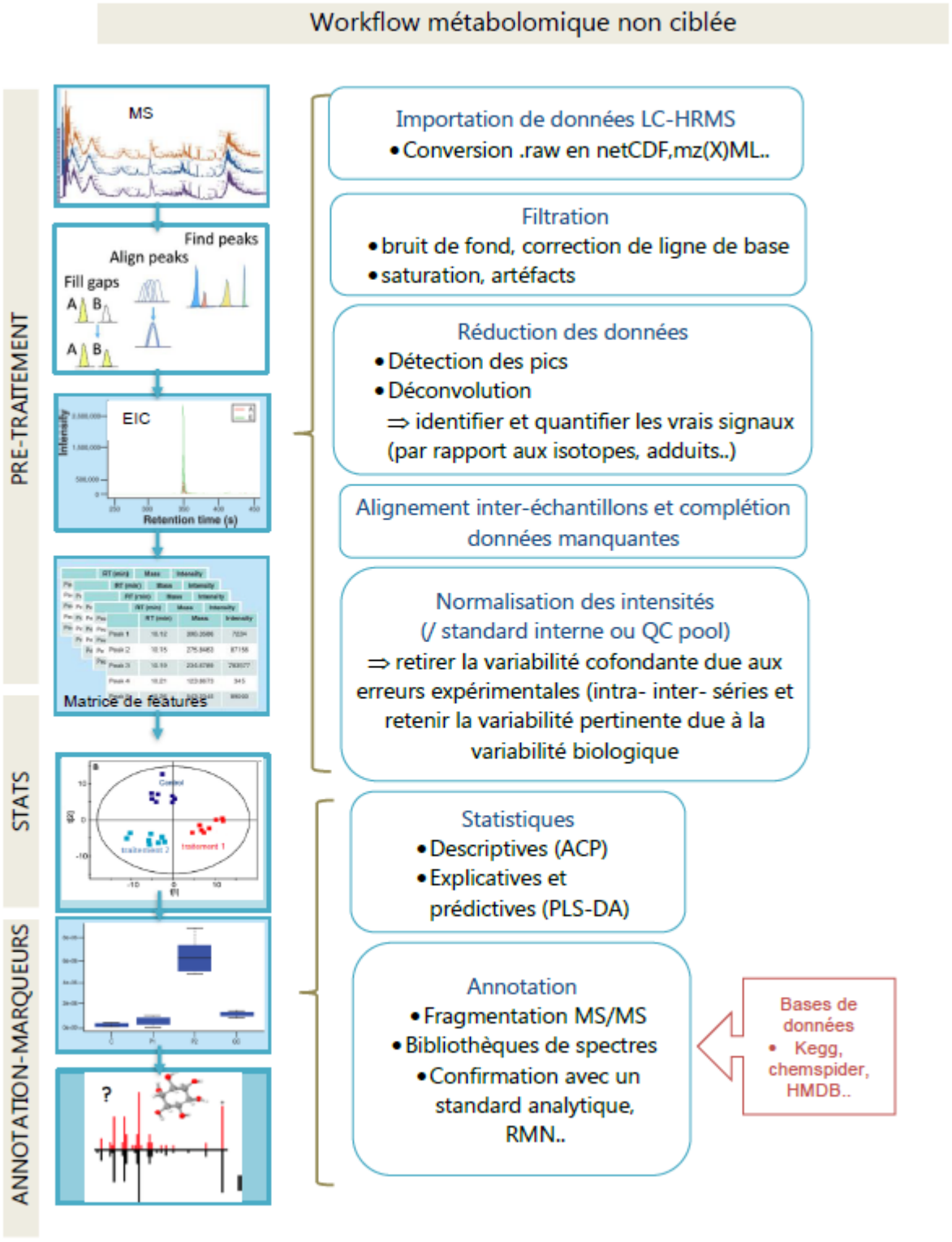


Figure 28 : Représentation du traitement de données d'une analyse métabolomique non ciblée. Source : modifié de (Gallard-Ayala et al., 2015).

Une fois le ou les signaux de potentiels marqueurs identifiés comme significativement modifiés biologiquement, un long chemin reste à parcourir jusqu'à leur identification formelle, appelée « annotation ». Le workflow suivi pour l'annotation de composés inconnus aboutit toujours à la consultation de bases de données proposant alors souvent plusieurs formules chimiques corrélées à la masse exacte du composé détecté et dont le niveau de correspondance est fonction de l'erreur de masse fixée par l'analyste (normalement inférieure à 5 ppm). Une fois qu'une formule a été sélectionnée, si le spectre expérimental MS/MS est aussi fourni, il peut être comparé avec les spectres théoriques fournis dans les banques de données. Mais l'attribution d'une identité sans équivoque ne pourra se faire qu'à l'aide du regroupement de différentes caractéristiques (masse exacte, schéma de fragmentation, profil isotopique) et de paramètres expérimentaux supplémentaires (par exemple, le temps de rétention et les spectres UV/VIS ou RMN). Enfin, il faudra confirmer les hypothèses avancées par comparaison avec les composés standards de ces molécules analysés dans les mêmes conditions. De plus, toute information biochimique, bibliographique, ainsi que toute autre information pertinente, doivent être prises en compte dans l'annotation du composé (Moco et al., 2007).

4.3 Profilage de métabolites exogènes à l'aide d'études *in vitro* et *in vivo*

L'approche par profilage des métabolites exogènes est différente de l'approche globale non ciblée présentée précédemment dans le sens où un *a priori* existe quant-à la connaissance des réactions du métabolisme. Même si l'acquisition de tous les signaux est choisie (mode full scan HRMS), leur traitement peut s'appliquer sans les outils chimiométriques, à partir d'une méthodologie semi-ciblée. Les échantillons générés simulant le métabolisme proviennent de méthodologies *in vitro* ou *in vivo*. L'intérêt pour les méthodes *in vitro* s'est considérablement accru ces dernières années pour des raisons économiques, pratiques et éthiques. L'utilisation de lignées cellulaires comme alternatives aux tests *in vivo* est de toute façon indispensable en particulier dans l'évaluation des risques sanitaires des produits chimiques, seuls ou en mélange, étant donné le nombre considérable de substances chimiques à tester. La démarche méthodologique *in vitro* pour un profilage de métabolites exogènes est présentée ci-dessous (**Figure 29**).

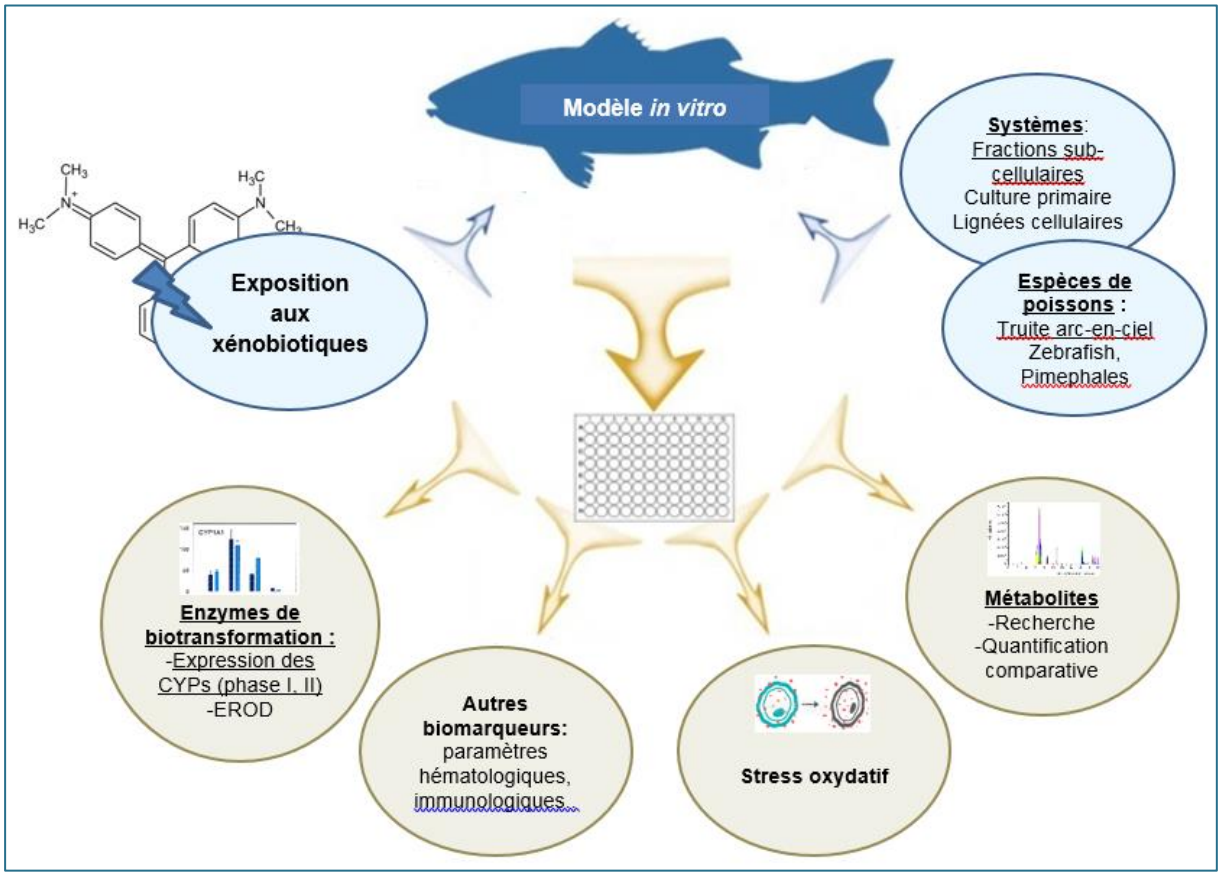


Figure 29 : Schéma conceptuel de la conception d'un modèle *in vitro* chez le poisson pour évaluer la biotransformation de xénobiotiques, et les biomarqueurs couramment examiné. Source : Inspiré de (Franco and Lavado, 2019).

4.3.1 Les systèmes *in vitro* pour les études du métabolisme chez le poisson

↳ Microsomes et fractions S9

Les systèmes *in vitro*, tels que **la fraction S9 ou les microsomes de foie**, sont intéressants à plus d'un titre car ils peuvent être mis en œuvre rapidement et sont relativement peu coûteux. Ce sont donc des modèles de choix pour les études de screening à haut débit. La fraction surnageante S9 est obtenue à partir d'un homogénat d'organe (généralement le foie) centrifugé à 9000 g pendant 20 minutes dans un milieu approprié. Cette fraction contient le cytosol et les microsomes. Les microsomes, contenant les isoformes CYP450 et d'autres enzymes du réticulum endoplasmique, peuvent être isolés de la fraction S9 par une seconde centrifugation.

Des fractions S9 de truite ont été utilisées afin d'estimer la clairance hépatique de produits pharmaceutiques, comme le diclofénac et le sulfaméthoxazole, par une approche de déplétion de substrat. Les résultats n'ont montré aucun métabolisme significatif mais plutôt une bioaccumulation (Connors et al., 2013). Zlabek et al ont utilisé les fractions microsomales dans

plusieurs études pour étudier le métabolisme de certains xénobiotiques et les CYP450 impliqués (Vestergren et al., 2012; Zlabek et al., 2016; Burkina et al., 2018a; Burkina et al., 2018b).

Pour des raisons économique et pratique, l'utilisation de fractions microsomales a été largement proposée pour des évaluations rapides du potentiel de bioaccumulation et de priorisation, un processus qui est devenu de plus en plus important depuis l'introduction de la réglementation européenne REACH en 2006. Le principe repose sur le fait qu'il existe une relation inverse entre le degré de métabolisme et le potentiel de bioaccumulation. Néanmoins ces systèmes *in vitro* ne reflètent qu'une partie de l'ensemble des processus métaboliques *in vivo* ou retrouvé dans des hépatocytes en culture primaire. Ces limitations, notamment l'absence de cofacteurs des enzymes de phase II, l'activité de courte durée dans les incubations et l'hypothèse inhérente d'absorption cellulaire de produits chimiques engendrent une prévision inexacte des taux métaboliques et des profils métaboliques (Uchea et al., 2013). Par conséquent, ces systèmes ne fournissent qu'une représentation partielle de la situation *in vivo* (**Tableau 12**).

Hépatocytes primaires

Les hépatocytes sont responsables de la majorité des fonctions hépatiques comme notamment la biotransformation des xénobiotiques. Ils sont donc souvent employés afin de déterminer la pharmacocinétique et le potentiel toxique de xénobiotiques *in vitro*. Les hépatocytes en culture primaire représentent *a priori*, le modèle cellulaire hépatique le plus proche de la situation *in vivo* chez l'homme, décrit souvent comme le « Gold standard ». En revanche ils présentent beaucoup de variabilité intra et inter-espèces. Fraichement isolés, les hépatocytes ne conservent leurs caractéristiques et les fonctions spécifiques du foie que transitoirement, et des altérations fonctionnelles et phénotypiques sont rapidement observées. De plus, leur disponibilité et leur survie sont limitées (Guillouzo, 1998). Actuellement, la cryoconservation est la seule méthode disponible à long terme pour le stockage d'hépatocytes primaires. Les hépatocytes de poissons peuvent également être utilisés, en fonction de l'espèce ciblée afin d'obtenir des données de biotransformation pertinentes (Fay et al., 2017).

Lignées cellulaires

Le premier intérêt pour les lignées cellulaires de poisson était principalement motivé par la pêche et leur intérêt économique pour l'étude des virus du poisson. Mais dans les années 80, ces lignées cellulaires ont également commencé à être utilisées lors d'études toxicologiques. Aujourd'hui, plus de 280 lignées cellulaires ont été établies, dont 43 sont commercialisées

(Lakra et al., 2011). Les lignées cellulaires de poissons sont considérées comme étant de meilleurs représentants que les lignées cellulaires de mammifères les plus couramment utilisées, car elles expriment des enzymes et des protéines spécifiques et peuvent être exposées à une plage de températures plus large pour l'incubation. Ils ne nécessitent pas d'incubateurs spécifiques complétés de dioxyde de carbone et peuvent être conservés pendant de longues périodes à 4°C, évitant les étapes de congélation et de décongélation inutiles. Elles sont donc plus faciles à entretenir et à manipuler et, contrairement aux cultures primaires, produisent des résultats hautement reproductibles (Wolf and Quimby, 1976). Elles ont été développées pour évaluer en particulier la toxicité des mélanges de produits chimiques tels que les HAPs, les produits pharmaceutiques ou encore les nanoparticules (Bermejo-Nogales et al., 2017).

D'autres tentatives pour rendre les systèmes *in vitro* plus réalistes, plus prédictifs et plus proche de l'*in vivo* ont reposé par exemple sur le développement de modèles tri-dimensionnels (3D) telles que les sphéroïdes d'hépatocytes pour prendre en compte les interactions cellulaires qui existent *in vivo*. Des sphéroïdes issues d'une lignée cellulaire hépatique de poisson de type RTL-W1 ont été produites et caractérisées fonctionnellement pour la première fois en 2019 (Lammel et al., 2019). Ces études suggèrent que les sphéroïdes des hépatocytes de truite arc-en-ciel conservent un statut biochimique, morphologique et fonctionnel élevé et qu'ils pourraient s'avérer être des modèles plus réalistes pour les tests de toxicité comparés aux monocouches 2D traditionnelles (Lammel et al., 2019). D'autres méthodes prometteuses dites méthodes de co-culture bénéficient des avantages apportés par les caractéristiques de plusieurs modèles cellulaires (Krøvel et al., 2011).

Tableau 12 : Principaux modèles issus de cellules hépatiques de poisson

Modèle cellulaire	Principales caractéristiques	Intérêt-Entretien	Référence
microsomes	Enzymes microsomales (CYPs), Systèmes non complets : pas d'organelles, pas d'enzymes et co-facteurs de conjugaison.	Economique. Conservation -80°C.	(Han et al., 2009)
S9	Cytosol (enzymes de conjugaison) et enzymes microsomales (CYPs), pas de cofacteurs de conjugaison.	Economique. Conservation -80°C.	(Uchea et al., 2013) (Connors et al., 2013) (OECD, 2018)
Lignées cellulaires de foie (RTL-W1)	Adhérentes, épithéliales. Faibles taux enzymatiques par rapport aux hépatocytes (CYPs et cofacteurs de conjugaison), Reproductibilité.	Maintenues dans le temps, résistantes aux ΔT°C. Plus simples que pour mammifères (faible taux métabolique).	(Lakra et al., 2011) (Thibaut et al., 2009)
Hepatocytes primaires de poisson	Membrane cellulaire intacte, caractéristiques préservées, variabilité (dépend de l'espèce) Nombreuses enzymes (CYPs et cofacteurs de conjugaison).	Stockage -135°C Maintenues peu de temps (pertes de capacité) mais facile d'utilisation (milieu, incubateur CO2 et T°C).	(Fay et al., 2017) (OECD, 2018)
Sphéroïdes	Cellules les plus représentatives du foie natif (forme, polarité). Expression des enzymes du métabolisme et des transporteurs membranaires.	Viables plus de 30 jours.	(Uchea et al., 2015) (Lammel et al., 2019)

4.3.2 Les enzymes CYP450 de biotransformation chez le poisson

Dans le milieu aquatique, l'exposition des organismes vivants aux xénobiotiques déclenche des interactions entre les systèmes chimiques et biochimiques, conduisant parfois à l'émergence chez l'animal de perturbations biochimiques et/ou à des réponse d'adaptation. Les biomarqueurs d'exposition sont des caractéristiques qui seront mesurées objectivement et évaluées comme indicateur d'un procédé biologique normal, d'un procédé pathologique, ou d'une réponse pharmacologique due à l'exposition de xénobiotiques (Van der Oost et al., 2003). Les voies générales généralement considérées sont le stress oxydant et le métabolisme. Une liste exhaustive de biomarqueurs de poisson a été examinée dans une revue portant sur l'estimation des risques environnementaux, comprenant: **les enzymes de biotransformation (phases I et II)**, les paramètres de stress oxydatif, **les produits de biotransformation (métabolites)**, les protéines de stress, d'autres protéines, et des paramètres divers (hématologiques, immunologiques, de reproduction, endocriniens, génotoxiques,

neuromusculaires, physiologiques, histologiques, morphologiques). Des voies plus spécifiques sont également analysées en fonction du type de produits chimiques pris en compte.

Lors de notre étude du métabolisme endogène, les activités enzymatiques CYP450 impliquées dans la biotransformation des xénobiotiques, ici les colorants, ont été examinées. Ces enzymes sont impliquées dans différentes phases du métabolisme comme explicité dans le paragraphe 1.3.3. Pour rappel, les enzymes de la superfamille CYP sont principalement responsables du métabolisme oxydatif de la phase I. Le CYP1A, essentiel et très instruit chez le poisson, est principalement responsable du métabolisme des HAP, des dioxines et des PCB et est induit par le récepteur nucléaire AhR. Son activité est un biomarqueur majeur en écotoxicologie. Le nombre d'isoformes du gène du CYP1 diffère entre les espèces de poisson. La truite arc-en-ciel détient au moins 6 isoformes (Jönsson et al., 2010). L'estimation de l'activité CYP1 se réalise facilement par la méthodologie de dosage de l'EROD (7-éthoxyresorufin O-deethylase). Le CYP3A est l'enzyme CYP la plus polyvalente. Elle est responsable du métabolisme de plusieurs types de produits chimiques, tels que les produits pharmaceutiques mais aussi les hormones stéroïdiennes. Chez le poisson, les CYP3 impliqués sont le CYP3A, dominant dans le foie, puis le CYP3B et le CYP3C. Le xénobiotique peut subir aussi une réaction de phase II consistant en la conjugaison des molécules hydrophiles avec le glutathion (GSH), l'acide sulfonique ou l'acide glucuronique avec pour objectif de faciliter leur excrétion. Les enzymes responsables sont les glutathion-S-transférases (GST), les sulfotransférases (SULT) et les UDP-glucuronosyltransférases (UGT). Enfin, en phase III, le composé métabolisé est excrété hors de la cellule. Le métabolisme se produit principalement dans le foie mais a également été observé dans d'autres organes tels que les branchies, l'intestin ou les reins (Van der Oost et al., 2003).

4.3.3 La truite arc-en-ciel comme modèle d'étude

↳ Une espèce très facile à élever

La truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) est l'espèce d'eau froide la plus étudiée, car les différents stades de maturité, de l'œuf à l'adulte, sont facilement disponibles pour des études (Wolf and Rumsey, 1985). L'habitat naturel de la plupart des truites arc-en-ciel est l'eau douce à une température d'environ 12 °C en été. L'espèce tolère des températures de 0 à 25 ° C mais l'optimum pour une bonne santé se situe entre 10 et 12 °C tandis qu'une excellente croissance dans des conditions de bonne qualité de l'eau se produit entre 15 et 20 °C. Les poissons mâles arrivent à maturité entre 9 et 12 mois à l'écloserie, mais pour la plupart, les stocks ont tendance à mûrir jusqu'à l'âge de 2 ou 3 ans selon la température de l'eau et la disponibilité de la

nourriture (Gall and Crandell, 1992). Facilement élevée et maintenue dans des conditions de laboratoire, la truite arc-en-ciel est un modèle utile et une espèce standard pour les tests de toxicité notamment. Elle est considérée comme l'une des espèces les plus sensibles en matière de toxicité aiguë et donc recommandée pour ces tests par l'OCDE parmi les espèces d'eau douce. Un avantage majeur de la truite arc-en-ciel est la grande diversité de lignées cellulaires établies à partir de cet organisme, ce qui laisse l'opportunité de comparer des tests *in vitro* aux études *in vivo*.

↳ Les organes majeurs du métabolisme

Les branchies sont un organe d'une importance vitale pour les poissons. Responsable des échanges gazeux, de l'osmorégulation, de la diffusion ionique, de la régulation du pH, du bilan azoté, il est le principal site d'absorption des contaminants d'origine hydrique. Cet organe est également métaboliquement actif. En raison du rôle pivot des branchies, tout dommage peut avoir des conséquences graves sur l'état de santé de l'organisme et il présente donc un grand intérêt en écotoxicologie (Evans et al., 2005). Un deuxième organe d'importance majeure en écotoxicologie du poisson est le foie en raison de ses capacités métaboliques élevées et de son rôle crucial de détoxication. Il est également très important pour la vitellogenèse, c'est-à-dire la production des réserves alimentaires des alevins. Un large éventail de biomarqueurs liés à cet organe a été caractérisé.

Partie II : Objectifs de la thèse

L'état des lieux des connaissances présenté dans la Partie 1 de ma thèse met en évidence le problème de santé pour les consommateurs, posé par les résidus chimiques issus des colorants utilisés en aquaculture. Il est par conséquent important de continuer à réaliser leur surveillance et si possible de la faire évoluer. En tant que laboratoire européen (LR-UE) en charge des activités de référence sur le contrôle de ces résidus de colorants, nous avons pour tâche de nous assurer que les méthodes analytiques pour les contrôler sont en adéquation avec les évolutions règlementaires et sociétales.

MG est le colorant de la famille des triarylméthanes (TAMs) le plus utilisé et aussi le plus étudié, car ses propriétés pharmacologiques sont multiples : antiparasitaire, antimicrobien, antifongique. Il permet de traiter un grand nombre de pathologies touchant les poissons d'élevage soumis à de nombreux stress liés à l'environnement et aux pratiques aquacoles notamment intensives. D'autres colorants similaires présentent des propriétés antibactériennes susceptibles d'être exploitées en particulier dans un contexte d'expansion et d'intensification de l'aquaculture. Le Cristal Violet (CV) aussi appelé Violet de Gentiane ou encore le Vert Brillant (BG) et parfois même le Bleu de Méthylène (MB) sont, en ce sens, déjà intégrés dans certaines méthodes d'analyse pour le contrôle officiel. La famille des Victoria représente une autre classe pertinente à étudier car ce sont des colorants dérivés des TAMs ; C'est d'ailleurs pourquoi le Victoria pure blue bo (VPBO) nous a paru pertinent à étudier plus spécifiquement.

En dépit de leur efficacité, les colorants sont à présent très réglementés dans l'Union Européenne du fait de leur toxicité pour l'homme et l'environnement. C'est pourquoi de nombreux pays ont adopté une tolérance dite « zéro résidus ». Leurs métabolites, sous forme de leucobases, sont également reconnus comme toxiques. S'accumulant dans les tissus animaux pendant de longues périodes après traitement, ils sont préférentiellement utilisés depuis plus de 20 ans dans les méthodes analytiques de contrôle comme marqueurs des traitements au CV ou au MG.

En Europe, la production aquacole des pays de l'Union ainsi que celle, importée des pays tiers, de plus en plus importante en volume, doivent par conséquent être surveillées pour l'occurrence de résidus de colorants en partant du postulat représenté par **les points suivants**:

1. Les colorants sont facilement disponibles, commercialisés en grandes quantités et peu couteux. Ils sont utilisés pour leurs propriétés dans de nombreux processus industriels (textiles, encres, révélateurs..) ;

2. Les données d'occurrence montrent qu'ils sont encore largement utilisés hors UE, en particulier en Asie (principale région du monde productrice en aquaculture) ;
3. L'utilisation de nouveaux colorants pourraient servir de substituts à ceux actuellement les plus connus et les mieux contrôlés,
4. Une liste de colorants substitutifs répertoriée par l'EFSA selon des considérations de toxicité, imposerait de les intégrer dans les futures méthodes analytiques de contrôle en lien avec une évolution réglementaire.

Au regard de ce postulat, la question de recherche qui en découle et qui est abordée dans le cadre de cette thèse est :

Quelle stratégie analytique adopter pour une surveillance sans faille dans la future réglementation pour tous les colorants interdits en traitement aquacole?

Les différentes pistes de recherche et les outils consacrés, qu'aborde le chapitre qui va suivre sous forme d'articles publiés, peuvent être déclinés selon trois points :

- Le premier article traite de la comparaison d'empreintes métaboliques par LC-HRMS chez la truite arc-en-ciel exposées au MG et au VPBO, et la recherche de potentielles substances biomarqueurs endogènes communes entre ces deux traitements. L'hypothèse de travail étant que ces colorants, de structures chimiques assez proches, peuvent engendrer un effet biologique commun. Si plusieurs études ont été consacrées à l'application de la métabolomique pour la recherche de marqueurs de traitements pour des substances anabolisantes chez les mammifères et animaux de rente, cette étude est la première à notre connaissance qui a été consacrée à l'application de la métabolomique chez le poisson d'élevage après un traitement thérapeutique, et la première également concernant les colorants.
- Le deuxième et le troisième article traitent de la recherche de métabolites exogènes par des études *in vitro* et *in vivo* visant à déceler des marqueurs pertinents pour un contrôle de dépistage par LC-HRMS, en appliquant non pas une approche de métabolomique globale mais une approche semi-ciblée.

  Le deuxième article décrit une méthodologie *in vitro* utilisant des fractions subcellulaires de foie de truite afin de rechercher les métabolites principaux du VPBO. Le troisième article concerne le métabolisme *in vivo* chez la truite traitée au VPBO, et la comparaison des métabolites observés à ceux déterminés *in vitro* dans le précédent article. Une déplétion tissulaire du métabolite principal est comparée à celle du VPBO.

Les supplementary data des articles 1,2,3 se trouvent en annexes 7,8, 9, respectivement.

- Enfin les approches analytiques pour l'évolution des méthodes de contrôle sont abordées dans l'article 1 et l'étude IV, par l'extension du nombre de colorants recherchés et par l'inclusion ou non de nouveaux résidus marqueurs. Le premier article aborde la démarche initiale qui consistait à mettre au point et valider une méthode de confirmation incluant une étape d'oxydation de tous les métabolites afin de quantifier seulement les composés parents de 14 colorants principaux. L'étude IV (non publiée) traite quant à elle d'une démarche analytique nouvelle, consistant à intégrer dans une même méthode analytique LC-MS/MS, les substances parentes, leurs métabolites principaux, et si possible des biomarqueurs endogènes d'effet observés dans les études publiées dans le troisième article. Cette méthode actuellement développée reste encore à caractériser au moyen d'une validation selon les critères de performances attendus pour les méthodes de contrôle officiel.

Partie III : Résultats

Article 1 : Dye residues in aquaculture products: Targeted and mass spectrometric approaches to track their abuse

1.1 Contexte

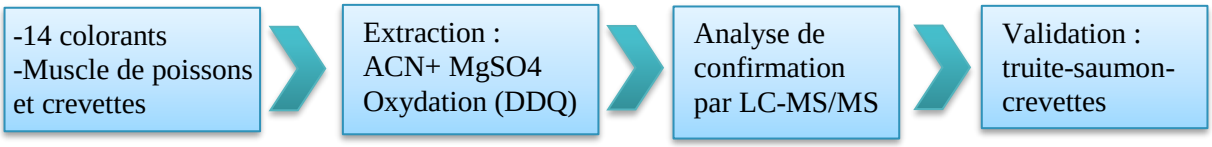
Ces résultats sont issus d'un projet intitulé Multicolor, mis en œuvre en partie à l'aide d'un travail réalisé par un étudiant de Master. Ce travail avait pour objectif d'initier une stratégie de surveillance élargie des colorants à usage thérapeutique par le développement d'approches analytiques ciblées et non ciblées. Le projet s'inscrivait dans un objectif méthodologique plus large que porte notre laboratoire en matière d'approches non ciblées pour la détection de marqueurs de traitement. Identifier un marqueur pertinent présente un intérêt dans plusieurs cas. Il permet par exemple d'identifier la signature biologique d'un traitement par un médicament aujourd'hui interdit dont le composé parental disparait rapidement après son administration à l'animal, ou encore de mettre en évidence cette signature imputable à un ensemble de molécules pharmacologiquement similaires. Pour cela, nous avons fait appel au savoir-faire de l'ONIRIS-Laberca qui a réalisé le traitement de données et les analyses statistiques multivariées. Ces données ont été reprises et complétées au laboratoire. Le projet Multicolor comportait ainsi 3 volets : le développement de l'approche analytique ciblée, une étude d'occurrence sur produits d'aquaculture du commerce en appliquant la méthode ciblée, et enfin l'approche de métabolomique non ciblée. Les deux approches, qui visaient soit à élargir le nombre de colorants ciblés dans le premier cas, soit à suivre des biomarqueurs appropriés dans le second cas, ont été étudiées de manière concomitante avec le même objectif d'améliorer la stratégie de surveillance des nouvelles pratiques illégales de traitements chimiques en aquaculture.

1.2 Méthodologie et principaux résultats

Méthodologie de l'approche ciblée :

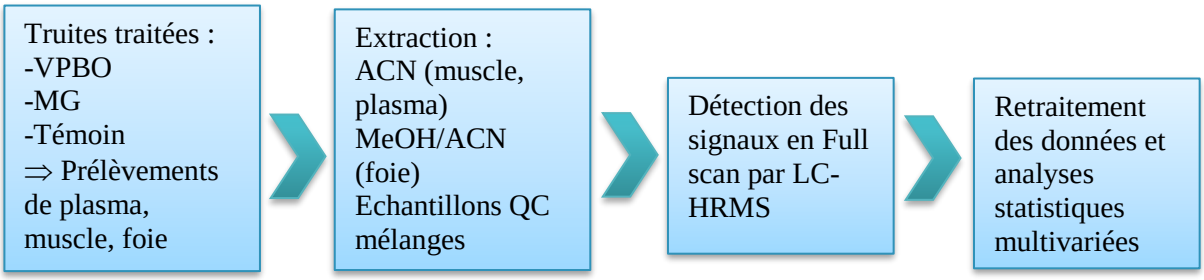
Une méthode LC-MS/MS comprenant une étape d'oxydation appliquée à la plupart des colorants sélectionnés a été développée et validée pour cibler l'analyse de 14 résidus chimiques appartenant à différentes familles de colorants. La méthode est appropriée pour la confirmation quantitative de 13 colorants dans la chair de poisson à des concentrations résiduelles de l'ordre de 1 µg/kg. Une étape d'oxydation a été intégrée à l'analyse afin de retransformer les substances

métabolisées et réduites en leuco-formes par les poissons, en leurs formes parentes, et de quantifier ensuite uniquement ces formes parentes. Tandis que chez certains TAMs les leuco-formes étaient déjà connues (la leucobase du vert de malachite par exemple), d'autres composés étaient probablement non connues, ou bien avaient fait l'objet d'une première identification récente et ne comportaient ainsi toujours pas le standard permettant de quantifier la forme réduite, comme c'est le cas pour le LBG. Les composés ciblés par la méthode comprenaient les principaux TAMs (MG, CV, BG, EV, PRRA), quelques autres dérivés des triarylméthanes (VBB, VBR, VPBO), des xanthènes (RHG), des phénothiazines (MB, AZB, NMB) et des phénoxazines (NBA). Ces colorants ont ensuite été recherchés sur des produits d'aquaculture collectés dans des commerces locaux.

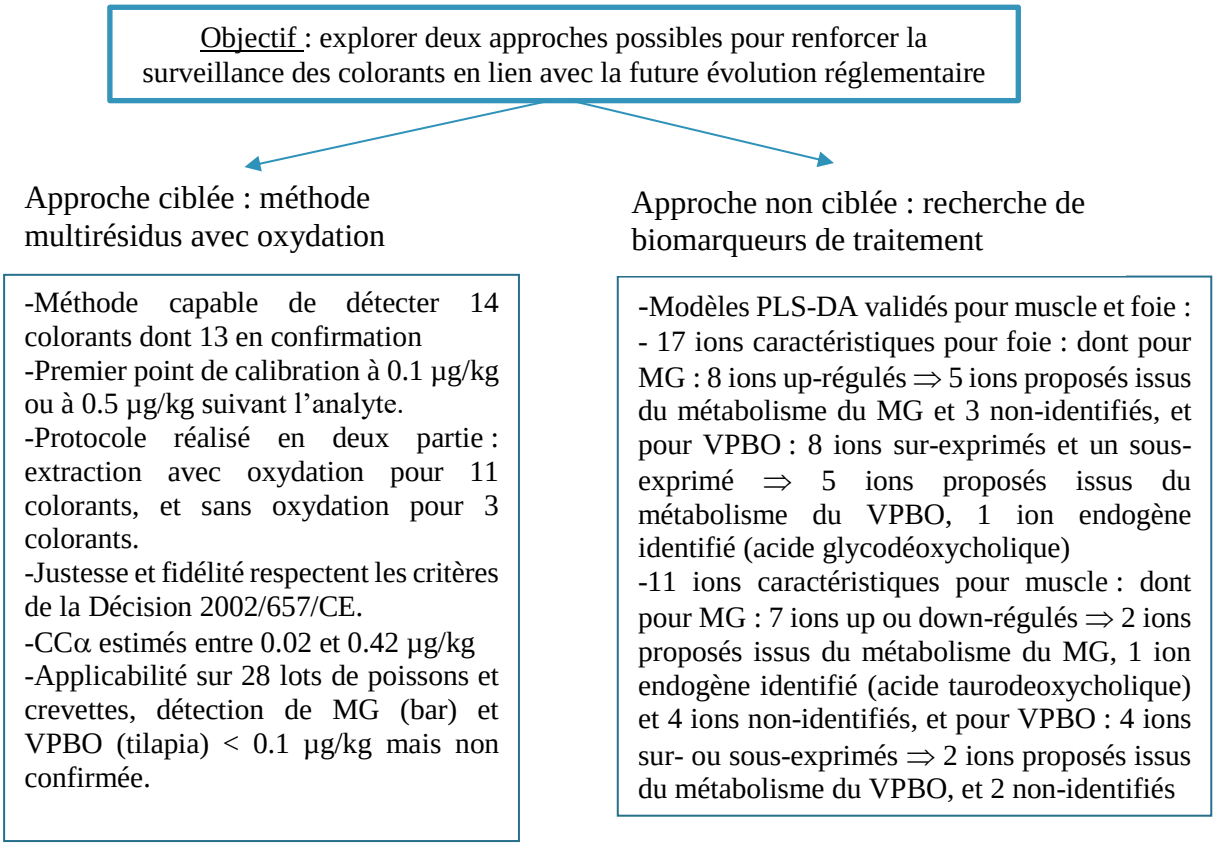


Méthodologie de l'approche ciblée :

Le deuxième objectif de ce projet était de rechercher tout marqueur de traitement des colorants au moyen d'une approche non ciblée basée sur la LC-HRMS en utilisant des échantillons biologiques de truites récoltés lors d'une expérimentation *in vivo*. Le principe de cette approche était de comparer les empreintes métaboliques obtenues avec des truites traitées à MG et celles obtenues avec des truites traitées à VPBO, avec pour objectif de détecter des marqueurs endogènes communs aux deux traitements ou encore de déterminer tout autre biomarqueur pertinent significatif d'un traitement par des colorants de type TAMs. Les informations extraites de l'analyse par LC-HRMS des ions caractéristiques provenant d'échantillons de muscles, de foie et de plasma ont été exploitées à l'aide de modèles statistiques multivariés. Elles ont révélé des modifications du métabolome de la truite générant certains métabolites directement liés aux 2 colorants mais également des substances endogènes perturbées suite au traitement.



Principaux résultats :



1.3 Conclusion

Les deux pistes explorées en vue d'étendre le contrôle des résidus de colorants interdits chez les produits d'aquaculture, pourraient se rejoindre et se compléter comme il est explicité en conclusion de l'article. La première piste consistait à déterminer si une méthode ciblée, incluant une oxydation pour pallier le manque d'informations et de standards analytiques pour tous les métabolites de tous les colorants concernés, pouvait être développée et validée avec une sensibilité suffisante pour tenir le challenge règlementaire autour du µg/kg. Les résultats ont montré que le protocole est applicable pour 11 colorants subissant l'étape d'oxydation et pour 3 colorants sans cette étape, car l'oxydation engendre probablement une dégradation de ces 3 composés. Les performances de la méthode sont satisfaisantes puisque les CCα sont inférieurs à 0.5 µg/kg. Les avantages de cette méthode sont le taux de recouvrement des colorants incluant les leuco-bases, connues et non connues, sa sensibilité, et sa facilité d'application. Les inconvénients sont d'une part, qu'elle inclut des colorants déjà suspectés mais pas de potentiels nouveaux colorants, et que d'autre part, l'étape d'oxydation correspond à une seule réaction de métabolisme, donc le champ des métabolites traceurs de traitement n'est pas entièrement

couvert. La deuxième piste consistait en l'investigation de métabolites endogènes marqueurs d'un traitement aux colorants, plus spécifiquement les TAMs et dérivés, en apportant des informations sur l'endo-métabolome des poissons.

Deux acides biliaires ont été subi une perturbation de leur voie d'expression chez la truite, mais aucun d'entre eux n'a pu être confirmé comme étant commun aux deux traitements issus des deux TAMs. Ceci laisse néanmoins présager d'un effet de ces colorants sur la voie de synthèse des acides biliaires. Cette étude a également mis en évidence des métabolites exogènes provenant directement d'une dégradation des colorants appliqués, dont les métabolites du VPBO, inconnus jusqu'ici. L'approche menant aux biomarqueurs d'effet d'un traitement (métabolites endogènes) mériterait d'être approfondie, et renforcée, afin de détecter d'autres biomarqueurs pouvant dans leur ensemble constituer un modèle prédictif de dépistage d'un traitement aux colorants. Enfin, ces deux pistes pourraient être combinées dans une même étude, afin d'obtenir une approche la plus exhaustive possible et générer des données d'occurrence par la méthode ciblée tout en étudiant l'impact de ces données d'occurrence sur des biomarqueurs comme les acides biliaires.

Food Chemistry 294 (2019) 355–367

Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem

Review

Dye residues in aquaculture products: Targeted and metabolomics mass spectrometric approaches to track their abuse

E. Dubreil[a,*], S. Mompelat[a], V. Kromer[a], Y. Guitton[b], M. Danion[c], T. Morin[c], D. Hurtaud-Pessel[a], E. Verdon[d]

[a] ANSES Fougeres Laboratory, Unit of Analysis of Residues and Contaminants, CS 40608-Javene, F-35306 Fougeres, France
[b] LABERCA, Oniris, INRA, Université Bretagne-Loire, 44307 Nantes, France
[c] ANSES Ploufragan-Plouzane Laboratory, Unit of Viral Pathology in Fish, F-22440 Ploufragan-Plouzane, France
[d] ANSES Fougeres Laboratory, European Union Reference Laboratory for Antibiotic and Dye Residue in Food, CS 40608-Javene, F-35306 Fougeres, France

ARTICLE INFO

Keywords:
Dyes
Malachite green
Victoria pure blue bo
Aquaculture products
Metabolomics
Multivariate analysis
Residue analysis
Mass spectrometry analysis

ABSTRACT

The aim of the study was to initiate an exhaustive strategy of control by implementing both targeted and non-targeted metabolomics approaches. A LC–MS/MS method including an oxidative step for most of dyes was developed and validated to target the analysis of 14 residues belonging to different families of dyes. The method was suitable for the quantitative confirmation of 13 dyes at low ppb levels. The metabolomics approach objective was to compare fingerprints between farmed fish treated with malachite green and farmed fish treated with victoria pure blue bo. Analytical information on modifications in the metabolome of muscle, liver and plasma was exploited by HRMS following by multivariate statistics and revealed some direct or endogenous metabolites among relevant mass features contributing to the constructed models. These two approaches, either appropriate biomarkers either enlarged targeted dyes are explored concomitantly to help improving the strategy for tracking new illegal practices in aquaculture.

1. Introduction

Dyes are substances used in aquaculture production that have been determined by international regulatory agencies to pose health-related hazards to consumers. Besides the use of dyes in aquaculture as biocides, dyes like malachite green (MG), are intensely used in industry to color silk, wool, cotton, wiping paper and newspaper, and also as food coloring agent, food additive, medical disinfectant and anthelmintic (Fallah & Barani, 2014). The multiple applications, the availability, the low cost of dyes generate a persistent presence of them in environment (Belpaire, Reyns, Geeraerts, & Van Loco, 2015; Khodabakhshi & Amin, 2012). This occurrence worries the authorities because dyes are demonstrated to induce toxicological effects (Srivastava, Singh, Srivastava, & Sinha, 1995) in relation to electron transfer, oxidative stress or other physiological effects (Culp et al., 2002, 1999; Kovacic & Somanathan, 2014). Thus the use of malachite green as veterinary medicine in aquaculture is now for more than 15 years illegal in Europe (Commission Decision No 2004/25/EC). Recently, EFSA has confirmed a Reference Point for Action (RPA) of 2 $\mu g\,kg^{-1}$, expressed as the sum of chromic- and leuco-form for the analysis of MG (Contam- Malachite (Scientific opinion), 2016). MG is as of today the only one dye having been assigned a RPA in the EU. Despite their ban in many countries, malachite green and other triarylmethane dyes are still used in some fish farming practices around the world. Tao et al. (2011) reported positive samples of malachite green and of crystal violet in salmon production. Extraction from the RASFF (Rapid Alert Reports for Food and Feed in EU) for alerts due to malachite green and its metabolite residues in fish shows that they were regularly found in farmed trout between 2002 and 2013 (Fallah & Barani, 2014). Moreover, it was assumed that it would be possible that other dyes might be selected to replace the well-known triarylmethanes like malachite green or crystal violet (Reyns, Belpaire, Geeraerts, & Van Loco, 2014; Tarbin, Chan, Stubbings, & Sharman, 2008). Other compounds derived from the family of triarylmethanes as the Victoria blue sub-family, or other dyes including phenothiazines, and phenyl azoic derivatives are often suggested but with no evidence acknowledged yet. Regarding the Victoria pure blue BO, the RASFF was notified in 2010 a first evidence of contamination of farmed fish imported from Vietnam (2010.1372 notification). Currently only some triarylmethane dyes known for their potential usage in aquaculture have been included in the French official control method: i.e., the malachite green and the crystal violet with their respective leuco-metabolites, and the brilliant green. It is therefore

* Corresponding author.
E-mail address: estelle.dubreil@anses.fr (E. Dubreil).

https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.056
Received 30 August 2018; Received in revised form 26 April 2019; Accepted 7 May 2019
Available online 09 May 2019
0308-8146/ © 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

necessary to start investigating the occurrence of residues of other families of dyes that were previously not forecast for their use in aquaculture. Some laboratories have already started to extend the scope of dyes in their analytical method regarding the only detection of malachite green, crystal violet and their leuco-metabolites. The multi-residue LC–MS/MS methods of Tarbin et al and of Reyns et al. (Reyns et al., 2014; Tarbin et al., 2008) include 13 and 14 dyes, respectively, allowing oxidation of the leuco-metabolites. In fact, malachite green and crystal violet when absorbed by fish are metabolized to form lipophilic reduced leucomalachite green (LMG) and leucocrystal violet (Thompson, Rushing, Gehring, & Lochmann, 1999). Hurtaud-Pessel, Couëdor, and Verdon (2011) have shown that brilliant green is also reduced in its leuco form. Some other dyes included in their method could also benefit from this oxidation that permits the quantitation regarding the only parent form. Another area to prospect on the occurrence of unknown used illegal drugs like dyes is to process metabolomics studies. For the characterization of complex biological samples, metabolomics is one of the promising strategies as it allows the production of a chemical pattern or fingerprint of the medicinal treatment. The specificity of the high resolution mass spectrometry (HRMS) facilitates the identification of the markers discovered through the elucidation of their chemical structures. The last decade provided the emergence of metabolomics strategies based on the observation of physiological perturbations in order to tackle drug abuse in animal breeding. Some metabolomics studies were implemented to study the effects of antibiotic treatment in animal tissues (Hermo, Gómez-Rodríguez, Barbosa, & Barrón, 2013; Hermo, Saurina, Barbosa, & Barrón, 2014) and to highlight some markers for a better food quality evaluation. Besides, drugs of abuse are more and more subject of studies in biological fluids to focus on changes of fingerprints (Arias et al., 2016; Dervilly-Pinel, Chereau, Cesbron, Monteau, & Le Bizec, 2015; Peng, Royer, Guitton, Le Bizec, & Dervilly-Pinel, 2017; Wu et al., 2015) and lead to metabolite identification or even descriptive and predictive models proposals.

In this study, we aim enlarging and improving the determination of dyes in aquaculture products by two complementary strategies. On the one hand, a multi-family method based on liquid chromatography and tandem mass spectrometry is developed to extend the scope of targeted dyes including an oxidizing step. Targeted compounds include the main triarylmethanes (malachite green, crystal violet, brilliant green, ethyl-violet, pararosaniline), and other triarylmethanes derivatives (victoria blue B, victoria blue R, victoria pure blue BO), xanthenes (rhodamine 6G), phenothiazines (methylene blue, azure B, new methylene blue), and phenoxazines (Nile blue A). On the other hand, the second objective is to determine any marker(s) of dye treatment through an untargeted approach based on the analysis by liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry of the samples harvested after appropriate farmed fish experimentations. To the best of our knowledge, this is the first time that metabolomics investigation is set up for dyes contaminated treated animals. The objective was to compare the general metabolic fingerprinting obtained from fish treated with a reference triarylmethane, the malachite green, with the one of fish treated with a derivative of triarylmethane, the victoria pure blue BO, with a final aim of determining common or any other relevant biomarkers of dye treatment.

2. Experimental

2.1. Chemicals, reagents and solutions

The standard substances malachite green (MG, purity of 96.9%), leuco-malachite green (LMG, purity of 98.5%), crystal violet (CV, purity of 92.7%), leuco-crystal violet (LCV, purity unknown estimated at 100%), brilliant green (BG, purity of 86.0%), ethyl violet (EV, purity of 92.8%), azure B (AZB, purity of 90.6%), methylene blue (MB, purity of 91.0%), new methylene blue (NMB, purity of 89.8%), Nile blue A (NBA, purity of 92.0%), pararosalinine (PRRA, purity of 97.0%), victoria blue R (VBR, purity of 92.2%), victoria blue B (VBB, purity of 93.0%), victoria pure blue BO (VPBO, purity of 91.4%), rhodamine B (RHB, purity of 97.9%) and rhodamine 6G (RHG, purity of 95.8%) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). The internal standard (IS) crystal violet-d_6 (CV-d_6) was obtained from Witega (Berlin, Germany). Stock solutions of the individual substances with a concentration of 100 µg mL^{-1} were prepared in either methanol for MG, BG, VBB, VBR, PRRA, NBA, RHB, RHG or acetonitrile for CV, VPBO, MB, NMB, EV, AZB, CV-d_6 and were kept stable in the dark at −20 °C during at least 1 month. For the targeted method, the dyes were divided into 2 groups during the validation according to their sensitivity. Further working standard solutions of the substances and their mixtures with appropriate concentrations were also produced by dilution with acetonitrile and were prepared fresh each day. These working solutions were prepared without MG and CV to spike the matrix-fortified validation samples (SV). The internal standard solution CV-d_6 was prepared at 100 µg L^{-1} in acetonitrile. Deionised water was prepared with a Milli-Q purifier (Millipore, St.-Quentin-en-Yvelines, France). Ammonium acetate, formic acid and 2,3-dichloro-5,6-dicyanobenzoquinone were from Merck (Darmstadt, Germany); ascorbic acid and anhydric magnesium sulfate from VWR (Fontenay-sous-Bois, France). Acetonitrile and methanol obtained from Fisher Scientific (St.-Quentin-Fallavier, France) were high performance liquid chromatography (HPLC)-grade and solvents. The solution of 2,3-dichloro-5,6-dicyanobenzoquinone (DDQ) was prepared at 5 mM L^{-1} in acetonitrile. The final solution of reconstitution was prepared by mixing 80% of acetonitrile and 20% of a solution of acid ascorbic at 1 g L^{-1}. The mobile phase A consisted of a mixture of ammonium acetate 10 mM L^{-1} and formic acid 0.1% in deionized water. The mobile phase B was 100% acetonitrile.

2.2. Targeted approach

2.2.1. Extraction procedure

Two grams of mixed muscle (fish or prawn) tissue were weighted into a clean centrifuge tube. The sample was spiked with an adequate volume from 100 to 400 µL of the working solution at 2 µg L^{-1} or 10 µg L^{-1} for less sensitive dyes. Then 50 µL of the internal standard solution and appropriate volumes of acetonitrile were added. The sample was vortex-mixed and let to stand for contact for 10 min in a dark place. Six mL of acetonitrile was added and then 0.5 g of $MgSO_4$ and the sample was again vortex-mixed to homogenize the material with the solvent. The sample was further placed on a mechanical rotary shaker for 10 min at 100 rpm and then centrifuged for 5 min at 4000 g refrigerated at 4 °C. A portion of 300 µL of the supernatant was transferred into a LC vial by filtration of the residue through a 0.45 µm syringe PVDF filter (Millex-HV, Merck Millipore, Guyancourt, France). This fraction was analysed by LC–MS/MS for the dyes NMB, PRRA and VPBO. 5 mL of the supernatant was subsequently transferred to a polypropylene tube and 2 mL of the DDQ solution was added. The sample was again placed on a mechanical rotary shaker for 30 min at 100 rpm. The sample was evaporated to dryness under gentle nitrogen flow at 50 °C. The residue was dissolved in the mixture solution for reconstitution (80% acetonitrile and 20% ascorbic acid), vortex-mixed and then centrifuged for 5 min at 20,000*g* refrigerated at +4 °C. The sample was transferred into the LC vial by filtration of the residue through a 0.45 µm syringe PVDF filter.

2.2.2. LC–MS/MS targeted analysis

Chromatography was performed on a Shimadzu LC-20AD-XR system (Kyoto, Japan) fitted with a Phenomenex Kinetex C18 column (100 mm × 2.1 mm, 2.6 µm) and protected with a C18 security guard system from Phenomenex. A gradient was applied and started with 30% B during 1 min. It was then raised to 80% B over 5.5 min, then set to 95% B for 0.1 min and hold for 3.4 min, and again set to 100% B for 0.1 min and hold for 4.4 min. The initial mobile phase composition was

then recovered over 1-min delay. The flow rate was 0.4 mL min^{-1}. The MS equipment consisted of a Sciex API5500 mass spectrometer (San Jose, CA, USA) controlled by the Analyst software (Vers. 1.6.2) operating in positive ion electrospray mode for the confirmation of the dye analytes (2 MRM transitions per analyte). The mass spectrometric conditions are depicted in supplementary data Table S1. The positioning of the source was adjusted; cone voltage and collision energy were tuned to optimize the transition of the precursor ion to the most abundant product ions monitored in the MRM mode. The following MS/MS parameters were used: source temperature, 600 °C; turbo-ion spray voltage, 2000 V; sheath gas pressure (air), 50 psi; auxiliary gas pressure (air), 55 psi; curtain gas, 30 psi.

2.2.3. Validation in aquaculture products

According to Commission Decision No 2002/657/EC (Community, 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, 2002), matrix-fortified calibration samples and matrix-fortified validation samples were selected to estimate the required qualitative and quantitative performance parameters. The adequate levels for fortifying these samples were chosen according to the sensitivity of the method. The lower levels acceptable near the limit of quantification were assessed during the development of the method. The different validation ranges for each of the analytes are described in Table 1. The calibrants consist of samples built with a blank matrix spiked with known concentrations of the analytes of interest. These samples are only used for calibration purposes. They must be prepared according to the protocol that will be further applied for routine checks. One calibrating series with relevant concentration levels including a blank sample and injected twice were replicated on three different days. These 3 × 2 series were considered for the building of the quantitative regression equation. The validation samples are the reconstituted samples with a blank matrix containing known concentrations of the analytes of interest. In the validation process, the validation samples describe the future real-life samples that the analytical procedure will have to quantify. Six replicates were used at each concentration level and for three days, that is to say 18 samples were prepared per level of concentration. Each day of validation was applied for one species (trout, salmon, prawns), and for each species 3 batches from different origins were studied.

The method's performance was assessed for each analyte through both its qualitative parameters such as retention time, specificity, signal/noise ratios, relative ion intensities, and its quantitative parameters such as linearity, accuracy in terms of trueness assessed through the evaluation of recovery and precision, limit of decision CCα.

2.2.4. Implementation of the method on routine samples

Application on aquaculture products purchased from local markets was carried out after the validation of the targeted method. Twenty-eight samples from different species and different origins were monitored: four batches of trout, seven batches of prawns, six batches of salmon, four batches of sea bass, three batches of turbot, one catfish, one tilapia, and one panga fish.

2.3. Metabolomics approach

2.3.1. Animal study and sample collection

The animal study was conducted in order to compare fingerprints to identify a possible metabolic correspondence. In fact, malachite green is the reference triarylmethane dye as it is demonstrated having very effective treatment in fish farming. VPBO was chosen because it has been proven a potential emerging dye in aquaculture (2010.1372 RASFF notification) and it is structurally close to triarylmethanes. So it is interesting to search for common effect biomarkers in case of other similar emerging dyes. Fig. 1 depicts the experimental design of the metabolomics study.

Table 1
Performance parameters obtained during the validation.

Analyte	Specificity (retention time, observation of blanks)	Identification (S/N)	Conclusion(s) SCREENING	Identification (ion ratios)	Validation range (µg kg^{-1})	Trueness (%)	Repeatability RSDr (%)	Intermediate precision RSDrw (%)	Linearity (Mean R^2)	Conclusion(s) CONFIRMATION	Decision limit CCα (µg kg^{-1})
CV with ox	C	C	✓	C	0.1–0.4	94.4–96.6	4.1–6.9	3.9–12.8	**0.9968**	✓	**0.02**
VBB with ox	C	C	✓	C	0.1–0.4	93.3–96.5	4.8–9.1	7.4–13.8	**0.9951**	✓	**0.03**
AZB with ox	C	C	✓	C	0.5–2.0	89.8–91.2	7.6–9.2	7.3–9.1	**0.9814**	✓	**0.27**
VBR with ox	C	C	✓	C	0.1–0.4	96.0–98.6	4.6–8.8	4.2–12.0	**0.9963**	✓	**0.03**
MB with ox	C	C	✓	C	0.5–2.0	87.6–89.7	8.9–9.8	10.2–12.7	**0.9673**	✓	**0.42**
BG with ox	C	C	✓	C	0.1–0.4	99.6–103.5	5.3–9.0	4.8–11.3	**0.9977**	✓	**0.02**
RHB with ox	C	C	✓	C	0.1–0.4	91.5–94.8	7.0–23.0	6.9–21.6	**0.9891**	✓	**0.04**
MG with ox	C	C	✓	C	0.1–0.4	91.8–93.6	15.7–19.2	22.8–26.5	**0.9914**	✓	**0.04**
EV with ox	C	C	✓	NC	0.1–0.4	79.2–88.5	12.0–16.1	14.2–17.7	**0.8879**	×	**0.15**
NBA with ox	C	C	✓	C	0.1–0.4	95.2–96.9	11.1–12.9	14.9–18.0	**0.9909**	✓	**0.04**
RHG with ox	C	C	✓	C	0.1–0.4	96.8–104.7	6.8–24.3	10.3–26.4	**0.9758**	✓	**0.06**
NMB without ox	C	C	✓	C	0.5–2.0	94.8–96.9	4.4–6.0	5.5–7.4	**0.9949**	✓	**0.14**
PRRA without ox	C	C	✓	C	0.1–0.4	92.7–96.0	6.8–8.6	7.2–9.8	**0.9871**	✓	**0.04**
VPBO without ox	C	C	✓	C	0.1–0.4	90.7–95.2	7.7–8.7	7.4–15.8	**0.9850**	✓	**0.06**

R^2 = determination coefficient.

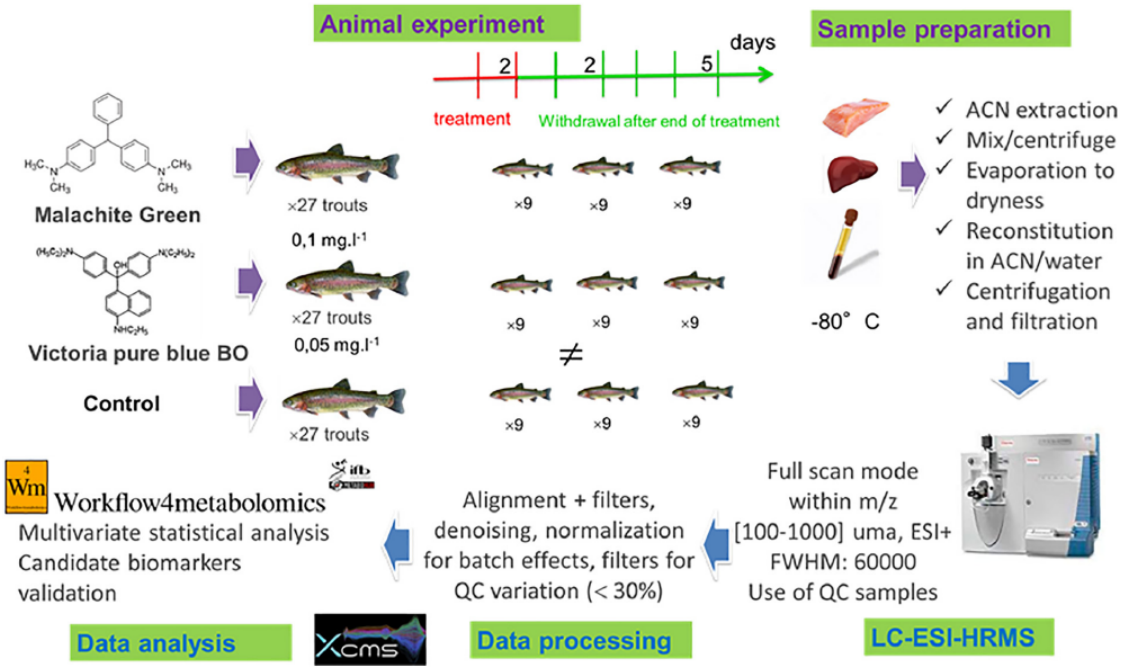


Fig. 1. Experimental design of the metabolomics study.

The objective of the animal study was based on two experimental procedures. During a pilot phase, the toxic effects of malachite green (MG) and of victoria pure blue BO (VPBO) on trouts were evaluated. In the literature some dose of administration for malachite green were suggested (Bajc, Jenčič, & Šinigoj Gačnik, 2011) however no data were found for the administration of victoria pure blue BO in aquaculture. The objective of the second phase was finally to search for metabolic fingerprints following administration of the two dyes on separate groups of trouts.

2.3.2. Fish

A total of 81 specific pathogen-free rainbow trouts composed of a mixture of males and females from the same genetic group were used for this experiment. The 81 rainbow trouts used for this experiment were sourced from virus-free fish rearing facilities of the ANSES Plouzané laboratory site (France). This batch of fishes was one year old and healthy specimens at the beginning of the project (105 ± 25 g and 15 ± 2 cm). Before the start of the experiments, some individuals were subjected to autopsies as well as to bacteriological and virological analyses to check their health status. They were fed with commercial dry pellets at 1.5 percent body weight (Neo Prima 4, Le Gouessant Aquaculture) once a day.

2.3.3. Authorization to experiment and ethical aspects

This experiment was conducted in accordance with European Commission recommendation 2007/526/EC on revised guidelines for the accommodation and care of animals used for experimental and other scientific purposes. The ANSES site of Plouzané holds the authorization to conduct experimentations on fish in its facilities according to the administrative order no. C29-212-3 delivered by the Prefecture of "Département du Finistère". Furthermore, the project in which this work took place was evaluated for a specific authorization issued by the French Ethics Committee Comité Français d'Ethique).

2.3.4. Experimental system

The experimental system consisted of six similar independent cylindrical tanks (75 L) in an open circuit with purified fresh river water at a flow rate of 0.3 $m^3 h^{-1}$. This water inlet maintained optimal water conditions for the fish (temperature of 13 ± 1 °C, dissolved oxygen < 90%, pH close to 8 and free of nitrate and nitrite) throughout the experiment. Tanks were maintained in a natural light/dark cycle (14 h/10 h in spring approximately) in a room with an air volume change every hour. Water temperature was continuously measured and recorded by means of a wireless probe (Cobalt, Oceasoft®) coupled to an acquisition system (ThermoClient 4.1.0.24). Oxygen saturation was monitored using Oxymeter WTW-OXI315I.

2.3.5. Exposure conditions and depuration period

Firstly, the 81 fishes were randomly distributed in three tanks of the experimental system. After one week in acclimation, the system was positioned in a closed-circuit system and one tank was exposed to 0.10 mg L^{-1} of MG, the second was exposed to 0.05 mg L^{-1} of VPBO, while the third was let free of dye exposition for control (same experimental procedures but without pollutant). After a 48-h bath, the fishes were transferred in three new tanks, for a five-day depuration period in a purified fresh river water open circuit.

2.3.6. Samples and sampling dates

Nine fishes were randomly sampled from each tank at three sampling dates, after the 48-hour exposure period, 30 h after the beginning of the depuration period and at the end of the five-day depuration period. For each fish, 2 mL of blood was withdrawn from the caudal vein by means of a lithium heparinized vacutainer (BD Vacutainer LH 85 IU). Whole blood samples were centrifuged (1200 g, 10 min, 4 °C) and plasma was stored at −80 °C. Fishes were killed after collecting blood by percussive stunning with a head blow and were then measured and weighed. Liver and muscles were removed and stored at −80 °C not more than two months for future analysis.

2.3.7. Sample preparation for plasma, liver, muscle

The sample was weighed (2 g of mixed muscle, 500 µL for plasma and 900 mg of mixed liver) into a centrifuge tube. Then 50 µL of the internal standard solution (MG-d_5 and CV-d_6 at 100 µg L^{-1} in acetonitrile) was added. The sample was vortex-mixed and let to stand for

10 min in a dark place. Then acetonitrile was added (8 mL for muscle, 4 mL for plasma) or a mixture of methanol/acetonitrile (50/50, v/v) for liver. The sample was vortex-mixed to homogenize the material with the solvent. The sample was further placed on a mechanical rotary shaker for 10 min at 100 rpm and centrifuged for 5 min at 4000*g* refrigerated at 4 °C. The supernatant was transferred to a polypropylene tube (5 mL for muscle, 4 mL for plasma and liver) and evaporated to dryness under gentle nitrogen flow at 50 °C. The residue was dissolved in acetonitrile/water for reconstitution (80/20, v/v) (600 µL for muscle, 400 µL for plasma and liver), vortex-mixed and then centrifuged for 5 min at 20,000*g* refrigerated at 4 °C. The sample was transferred into the LC vial by filtration of the residue through a 0.45 µm syringe PVDF filter. A pooled quality-control (QC) sample for each matrix was prepared by combining 5 µL of each extract from each sample.

2.3.8. LC-HRMS analysis

Chromatography was performed on a Thermofisher U-HPLC Accela system (Bremen, Germany) fitted with a Waters Xbridge BEH C18 column (100 mm × 2.1 mm, 2.5 µm) and protected with a C18 security guard system from Phenomenex. A gradient was applied and started with 2% B. It was then raised to 98% B over 13 min and hold for 4 min. The initial composition was then recovered over a 1-min delay. The flow rate was 0.30 mL min^{-1}. The MS equipment consisted of a LTQ Orbitrap XL MS mass spectrometer (Thermofisher, Bremen, Germany) controlled by the Xcalibur software (Vers. 1.6.0) operating in positive ion electrospray mode of the analytes. The positioning of the source was adjusted to obtain the optimal signals. The following parameters were used: capillary temperature, 275 °C; turbo-ion spray voltage, 5000 V; sheath gas pressure (air), 30 (arbitrary unit); auxiliary gas pressure (air), 10 (arbitrary unit); sweep gas, 2 (arbitrary unit). The instrument was calibrated to reach mass accuracies in the 1–3 ppm range. It was operated in full-scan FTMS over *m/z* range of 100–1000 Da at a resolving power of 60,000 (full width at half maximum). For each matrix, LC-HRMS samples acquisitions were randomized and quality-control (QC) samples for each batch, were injected every 5 samples in the sequences.

2.3.9. Data processing and statistical analysis

The raw (*.raw) LC-HRMS files were converted to a more exchangeable format (*.mzXML) using MSConvert. The data were then processed using both R software (xcms 1.44) and the collaborative Galaxy platform "Workflow4metabolomics" version 3.0 (Giacomoni et al., 2015). Workflow4metabolomics, a collaborative research infrastructure for computational metabolomics, is a collaborative tool for comprehensive metabolomics data pre-processing, statistical analysis, and annotation (Giacomoni et al., 2015; Guitton et al., 2017).

Because there were numerous satellite peaks as artifacts from Fourier Transform calculations, the converted MS data files were firstly filtered by eliminating all *m/z* signals higher than 750 Da. This filtration was made with in-house R scripts to improve quality of data. Then the overall workflow of data processing consisted in as follows: (1) the peak extraction (xcms R package) (Smith, Want, O'Maille, Abagyan, & Siuzdak, 2006), (2) the peak alignment (xcms R package), (3) the filtering of *m/z* within the range of [45–1020] seconds by eliminated all non-gaussian profiles, (4) the elimination of the colinearity between ions, more precisely the filtration of isotopic ions or adducts after annotation with the CAMERA package (Kuhl, Tautenhahn, Böttcher, Larson, & Neumann, 2012), (5) the normalization in order to correct the signal drift and batch-effects by fitting a locally weighted regression model (Lowess) to the QC values (Van Der Kloet, Bobeldijk, Verheij, & Jellema, 2009), (6) the elimination of ions having a coefficient of variation (CV) of signal intensity higher than 30% in QC pool sample.

The parameter settings used for peak detection and alignment were optimized using the R-package IPO ('Isotopologue Parameter Optimization') (Libiseller et al., 2015).

The optimal parameter settings which were used for the overall process of data are presented in supplementary data Table S2.

Before normalization, a table matrix containing the intensity areas for each feature defined by the couple retention time and *m/z* was generated. Then, after normalization and the different filtration steps, the refined matrix was used for statistical analysis of data. Statistical analysis was performed by using the implemented tools on Workflow4metabolomics (Giacomoni et al., 2015) and Simca v. 14.0.0.1359 (Umetrics AB).

The most commonly used unsupervised multivariate analysis, i.e. Principal Component Analysis (PCA), was firstly performed for each matrix (muscle, liver and plasma) in order to visualize any patterns and groupings within the data without considering the belonging of the samples to a group ('Control' or 'Treated' group). PCA technique consists in the reduction of the dimensionality of a dataset containing a higher number of variables than number of samples, and transformation into few orthogonal latent variables called principal component (PC). In that way, the PC representing the greatest variability in the dataset is susceptible to give information about the origin of the variability, i.e. whether or not it is assigned to the treatment with dyes. Once Log_{10}-transformed and Pareto scaled, data were submitted to PCA analysis with the algorithm svd.

Supervised partial least square discriminant analysis (PLS-DA) were then conducted in order to find the features (ions) causing the highest discrimination between the groups of samples ('Control' versus 'Treated' group). These potential markers of treatment with dye were selected according to the criterion named "Variable of Importance in the Projection" (VIP). VIP criterion is a measure of the contribution of the feature (variable) in the model besides its importance in the prediction of the response variable (i.e. the group of the sample). Similar to PCA modelling, data were Log_{10}-transformed and pareto scaled before PLS-DA which was proceeding under the algorithm nipals. Diagnostic statistics were also carried out in order to check the quality and performances of the constructed model (R^2X, R^2Y, Q^2Y, the permutation diagnosis, the detection of outliers by scoring, and cross validation performances).

Univariate analyses were also performed to determine which features differed significantly from 'Control' to 'Treated' group according to their signal intensity. In that aim, Student's tests and non-parametric tests of Wilcoxon were both carried out with a Bonferroni correction and a p-value threshold set at 0.05.

The ultimate selection of markers of treatment was made by the gathering of all results obtained from all multivariate and univariate analyses, and the comparison between all these results. At last, the analytical qualities of the selected markers were evaluated through the examination of their respective extracted ion chromatograms (EICs).

Two procedures were used for the identification of potential biomarkers. First, direct metabolite formation investigations were made using MetWorks 1.3.0. SP1. Software (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The extraction's mass window was set at 5 ppm. Tentative identification of the endogenous markers was then carried out by using three different databases: Chemspider, KEGG, HMDB, and assigning possible adducts with K, NH_4, Na, H with accounting an experimental error lower than ± 5 ppm.

3. Results and discussion

3.1. Targeted LC–MS/MS approach

3.1.1. Sample preparation

According to Annex I of Directive (EC) No 96/23 for the substances to be controlled in foodstuffs of animal origin, the pharmacologically active dyes belong to the Group B3e. Currently, only the malachite green has been set a RPA of 2 µg kg^{-1} for the sum of malachite green and its leuco-base metabolite (Contam- Malachite (Scientific opinion), 2016).

In France, the current official method for controlling residues of

dyes of interest monitors three compounds: the malachite green, the crystal violet and the brilliant green. The occurrence of the malachite green residues in food from aquaculture origin tends to decrease over the 15 past years worldwide when other dyes are now disclosed in the literature as potential zootechnical agents. During our project, a targeted and very sensitive method was developed and validated to extend the scope of investigation of these compounds. Regarding the number of dyes included in the mass spectrometric methods found in the current literature, a first evolution was to include the crystal violet and the brilliant green in the analytical control (Andersen et al., 2009; Doerge, Churchwell, Gehring, Pu, & Plakas, 1998; Hurtaud-Pessel et al., 2011). More recently, multi-class methods for control of dyes in seafood appeared over the last ten years (Reyns et al., 2014; Sun, Sun, Li, Zhang, & Yang, 2013; Tarbin et al., 2008; Xu et al., 2012).

Derived from the methods of Tarbin et al. and of Reyns et al., the present method aims at confirming and quantifying by LC–MS/MS the residues of 14 dyes in aquaculture products. The dyes chosen to be included were similar to those in the Tarbin and Reyns methods, i.e. arising from five families, as our review from the literature showed that no other potential pharmacologically active dyes are currently depicted. For the chromatographic separation, a compromise between UHPLC and classical HPLC separation was defined. A 2.7 µm analytical column conditioned in a 14-min run gave efficient separations especially from interferences brought by fat fishes such as salmon or trout. The target tissues for this study were: 1 – trout tissues because of this major finfish freshwater farming production in France, and 2 – salmon and prawns because of their high rate of import and European consumption. Some of these dyes are already known to be rapidly metabolized in their reduced leuco form and most of the analytical methods described in the literature target the known leuco-bases (leuco malachite green, leuco crystal violet). However, potentially existing leuco forms of other dyes may have to be monitored as well and all the relevant chemical standards are not necessarily commercially available. This is the case for instance for the leuco brilliant green already described by Hurtaud-Pessel et al. (2011). The analytical method we have developed in line with some other similar methods from the literature, aims at oxidizing the leuco metabolites to finally dosing the only parent molecules instead. The applied oxidation originates from the Roybal et al. extraction (Andersen, Turnipseed, & Roybal, 2006; Turnipseed, Andersen, & Roybal, 2005) who proposed to add the oxidant, 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone (DDQ), directly during the extraction step. This improvement brought enough sensitivity to convert the leuco malachite green into malachite green and DDQ was adopted by some other authors (Reyns et al., 2014; Tarbin et al., 2008). During the development of our standard operating procedure, the optimal amount of DDQ was set at a volume of 2 mL at 5 mM, a lower volume conducted to incomplete oxidation in our case. Besides it was noticed that some compounds, pararosalinine, new methylene blue, and victoria pure blue BO, undergo a loss at above 50% caused by oxidation and also show an alteration of the peaks. So it was undertaken to validate the method in two parts, one with oxidation and one without oxidation, and to collect and compare the validation data. The extraction was performed with 6 mL of acetonitrile and addition of anhydric $MgSO_4$ for 2 g of matrix. No purification by solid phase extraction was set up as performance and quantitation were satisfying during the process of development. Moreover, after the total evaporation of the extract, the volume of reconstitution solution added to the extract (600 µL) was found enough to avoid troublesome matrix effects. The choice was made to reconstitute the samples with a mixed solution of acetonitrile and of ascorbic acid to stabilize the parent forms once they are converted.

For the validation without oxidation, a small fraction of 300 µL was removed from the extract just before the oxidation step and sent to LC–MS/MS directly after filtration.

3.1.2. Validation

The validation was performed in accordance with criteria of performance from the Commission Decision (EC) No 2002/657. Matrix-fortified calibration standards (SC) and matrix-fortified validation samples (SV) were selected to estimate the required qualitative and quantitative performance parameters to be validated (Dubreil-Chéneau, Pirotais, Verdon, & Hurtaud-Pessel, 2014). The adequate levels for fortifying the SC and SV samples were chosen following the sensitivity of the dyes and then separated in two level groups. Each day of validation was devoted to one species (trout, salmon, prawns) and four different origins were used per species, one for the calibration curve and three other origins for the SVs. All validation parameters, e.g., the decision limit CCα, the detection capability CCβ, the precision, and the recovery were evaluated. The levels for SC and SV ranged between 0.1 and 0.4 $\mu g\,kg^{-1}$ for eleven compounds and between 0.5 and 2.0 $\mu g\,kg^{-1}$ for three compounds AZB, MB, NMB (see all results in Table 1).

Identification criteria. Pharmacologically active dyes are non-authorized substances in seafood-producing species. So four identification points are necessarily earned by monitoring two MRM transitions for each of the 14 analytes to detect each of them unequivocally. The specificity of the method was tested for the two MRM transitions of each analyte by comparing three types of chromatograms obtained from standard solutions, from different blank samples and from spiked matrices, respectively. No interference was observed at the retention times of any of the 14 dyes and of their internal standards. Fig. 2 shows a chromatogram of a spiked trout muscle sample at the first level of quantification.

The ion ratios corresponding to the least intense versus the most intense signal, and the signal-to-noise ratios were calculated for each analyte on the SC and SV. The relative deviations of the ion ratios according to Decision (EC) 2002/657 were satisfactory for all analytes (see supplementary data Table S1). The signal-to-noise ratios were also all satisfactory, as indicated in Table 1, with values far greater than three.

Quantitative criteria. Response linearity was determined using a linear regression model. One matrix-fortified calibration curve was built each day with four calibration levels in concentration ranging between 0.1 and 0.4 $\mu g\,kg^{-1}$ for eleven compounds and between 0.5 and 2.0 $\mu g\,kg^{-1}$ for the three compounds AZB, MB, NMB. Linearity was successfully achieved over the calibration range of the method with R^2 above 0.96 for all the analytes except EV. EV did not reach a sufficient linearity (mean R^2 of 0.8879) because a stability decrease was observed during the batch analysis. A decrease by two of the area between the first calibration curve and the second calibration curve precluded to fully validate the method for EV. This issue should be further investigated in near future. For other compounds, calibrating curves were all considered linear, with coefficients of determination (R^2) over 0.9673 for MB. Trueness was assessed through the recovery calculated from the matrix-fortified calibration curve created each day by back-calculating the SV concentrations at each level of concentration. The percentage of recovery was given by the mean of the back-calculated concentrations for each level of concentration divided by the theoretical spiked concentration. Table 1 displays the recovery results in terms of trueness. Commission Decision (EC) No 2002/657 recommends trueness between 50% and 120% for concentrations below 1 $\mu g\,kg^{-1}$, and trueness between 70% and 110% for concentrations between 1 and 10 $\mu g\,kg^{-1}$. Therefore, all results fulfilled the recommendations. For the 11 dyes detected after oxidation, the values ranged from 79.2% for EV to 104.7% for RHG. For the three compounds validated without oxidation, i.e. new methylene blue, pararosaniline, and victoria pure blue BO, respectively, results ranged from 90.7% to 96.9%. The precision of the method was evaluated at each SV level of concentration by

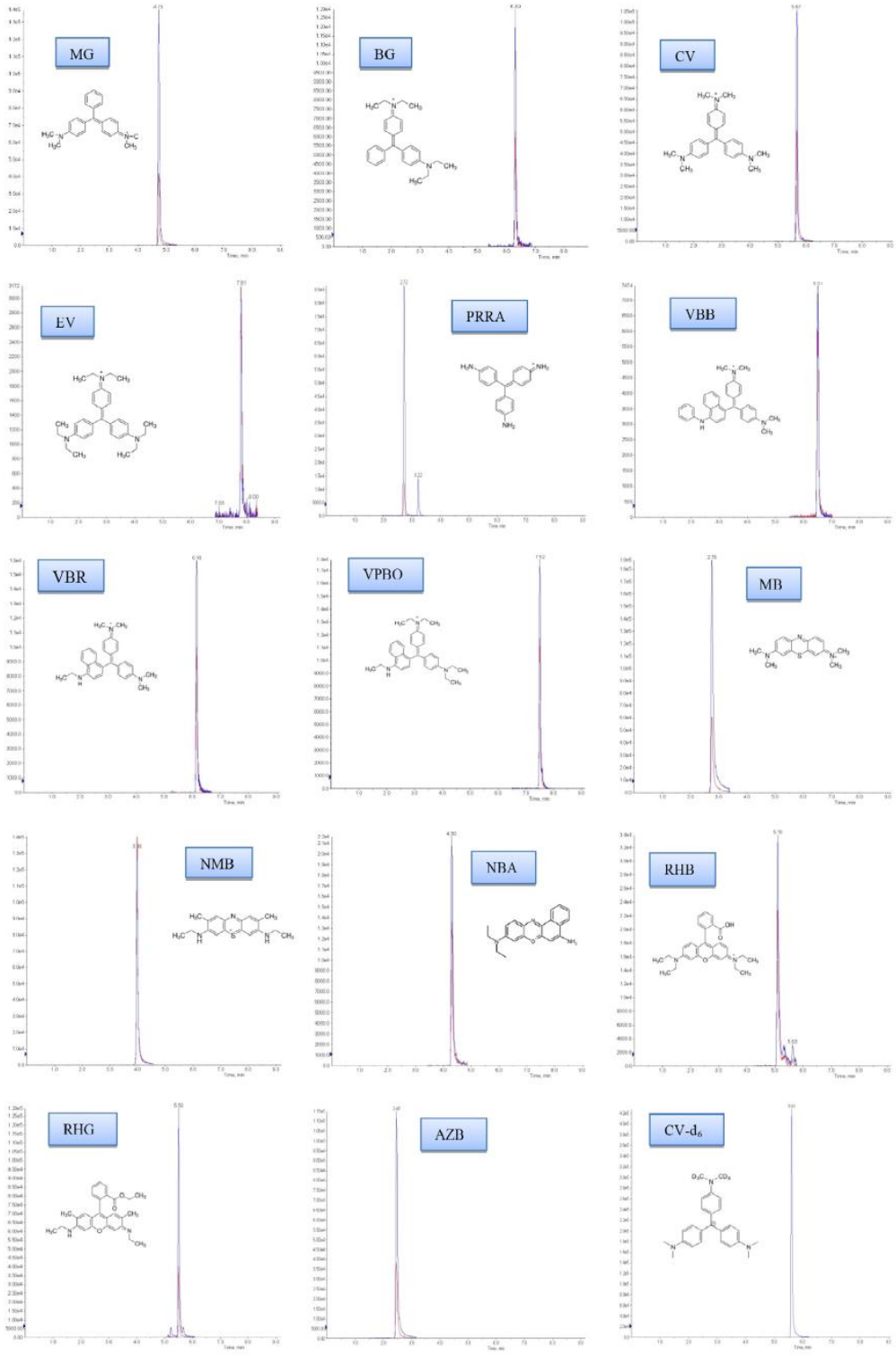


Fig. 2. Extracted MS/MS chromatograms of all dyes spiked in trout tissue at concentration at level 1.

calculating the relative standard deviation (RSD%) in repeatability conditions (RSD calculated from the six replicate SVs of the day) and in intra-laboratory reproducibility conditions (RSD calculated from the 18 replicate SVs over three days). Table 1 gives the results of repeatability (RSDr%) and intermediate precision (intra-laboratory reproducibility, RSDrw%) tests. The highest RSD obtained for precision were 23.0% for RHB and 24.3% for RHG, and 26.5% for MG and 26.4% for RHG for intermediate precision. The RSDs for concentrations lower than

100 μg kg^{-1} shall be as low as possible according Commission Decision No 2002/657/EC. We consider that 30% for RSDr and RSDrw is an acceptable limit for the coefficient of variation considering this very low range of concentration, which is the case for results for all validation concentrations.

The critical limit CCα was determined in accordance with the so-called calibration curve procedure of the ISO Standard 11843 and considering the case of the linear regression, as proposed in European Decision N° 2002/657/EC. The highest CCα obtained for the 11 compounds in the validated range of 0.1–0.4 μg kg^{-1} was 0.06 μg kg^{-1} for RHG. For the 3 compounds in the validation range of 0.5–2.0 μg kg^{-1}, the highest CCα obtained was 0.42 μg kg^{-1} for MB. It is generally accepted the maximum CCα for a non-authorized substance shall tie at least to the first level of calibration to be chosen below the regulatory RPA. All our results fulfill this requirement except for EV because of excessive variation in the second injection of the calibration curve.

Based on the quantitative criteria of the Commission Decision (EC) No 2002/657, all the quantitative technical performance criteria are met for all the 14 dyes except for the ethyl violet (EV). For the confirmatory identification purpose of the analytical method and over the 14-targeted dyes included, 10 of them were fully validated from those with the oxidation step, and also the 3 dyes without the oxidation step were fully validated as well. The levels achieved for the decision limits were all assessed below 0.5 μg kg^{-1}, that are far below the RPA proposed at 2 μg kg^{-1}. For screening, the method is fit for purpose for the 14 dyes. The method is also fully validated for different aquaculture species. Inter and intra-species variability was additionally included in the validation results. In conclusion the LC–MS/MS targeted method is applicable for confirmation in aquaculture products, for the following dyes:

- with oxidation: crystal violet, victoria blue B, azure B, victoria blue R, methylene blue, brilliant green, rhodamine B, malachite green, ethyl violet, Nile blue A, rhodamine 6G
- without oxidation: new methylene blue, pararosaniline, victoria pure blue BO

3.1.3. Analysis of marketed aquaculture products

An experimental plan specifically dedicated to this project study was carried out using the targeted method for the 28 samples (8 species) collected from local markets. Two samples were suspected containing dyes (MG, VPBO) at very low concentrations, and below the first level of calibration. An estimated concentration at 0.036 μg kg^{-1} of MG in a seabass and an estimated concentration at 0.066 μg kg^{-1} of VPBO in Tilapia were noticed. Even identification criteria were fulfilled, the estimated concentrations were far below the first concentration of calibrants at 0.1 μg kg^{-1} for theses dyes. For this reason, only screening was implemented and confirmatory step of these two samples in duplicate was not initiated.

3.2. Metabolomics LC-HRMS approach

3.2.1. Metabolomics study conditions

The animal experiment involved homogeneous animal population in terms of age, breed and nutrition. Breeding is the first key step to control in a metabolomics study. Such studies have been poorly applied to farmed fish and particularly for trout exposed to chemical contaminants (Samuelsson, Björlenius, Förlin, & Larsson, 2011). To our knowledge, only De Sotto et al. (2016) reported a metabolomics study in fish (zebrafish) applied to pharmacologically active substances, a sulfonamide.

The item of our study was one year old juvenile trout. At this stage, the immune and antioxidant capacities are mature but not yet interfering with reproduction. Rainbow trout has long been a model species in toxicology. Moreover, trout fish farming has a very strong economic importance in France. It appears to be relevant for our study and under full control in our fish experimentation facilities. To ensure adequate breeding conditions it was carried out several actions: observation of the living behavior, removal of the dead, emptying of the water bath and cleaning, food (ad libitum), control of the temperature of the water and of the main physicochemical parameters. The administration dose fixed after the pre-toxicity study was 0.10 mg L^{-1} in a controlled water bath during 2 days for MG and 0.05 mg L^{-1} in a controlled water bath during 2 days for VPBO. Despite all precautions, we observed the death of sevens trout during VPBO treatment due to a technical issue with the air intake. So a batch of five trouts were kept for the 30 h depuration period and 6 for the five day depuration period instead of nine each. During the study, a control group was bred simultaneously and same number of control trout was taken simultaneously as for treated trout. Only one death was observed in the controls. When sampling, the biological matrices (liver, muscle, and plasma) were stored immediately at −80 °C to avoid any alteration. For analysis of samples, it was made typical choices in terms of extraction and analysis by LC-HRMS. Metabolomics analyses presume that the analyst will spend a lot of time on data treatment, and in this case for the three selected matrices. So decision was taken to perform only one extraction condition per matrix (acetonitrile or methanol extractions) and to analyse samples in ESI positive polarity only. In fact, methanol and acetonitrile are generic solvents most often able to extract molecules in a wide polarity range. ESI positive polarity was chosen because it allows to correctly detect the positively charged triarylmethanes and their major potential metabolites as well as theoretically a larger number of endogenous metabolites (Knolhoff, Kneapler, & Croley, 2019).

The data acquired by LC-HRMS in full scan for the «treated trout from each dye group: the MG group and the VPBO group (VB-called on PLS-DA graphs)» were compared together to the «group of non-treated trout or control group», by operating statistical data treatments on the generated datasets. The repeatability and quality of data acquisition was checked by using two isotope labeled internal standards and by injection of quality-control (QC) samples for each batch. A correct alignment of extracted peaks was obtained for peaks below 750 Da. The method was optimized in order to get fingerprinting of samples so no quantification of MG and VPBO and no CID experiment were additionally performed. Peak area of MG and VPBO were collected for plasma, muscle and liver at the different times of treatment in order to assess trends of depletion of parent compounds. The surface time profiles of MG and VPBO in the different matrices during treatment and after treatment are presented in Fig. 3. The MG and VPBO behavior were similar in the different matrices with a slight decrease in plasma and muscle and a stronger decrease in liver at 4 days after withdrawal of treatment. The depuration period of 4 days was not sufficient to eliminate completely the parent dyes. This is in compliance with literature where MG as its colored form without measurement of LMG is displayed to be persistent up to 60 days after a 6 days long bath exposure (Máchová et al., 1996).

3.2.2. Multivariate statistical fingerprinting

The Galaxy platform permitted to obtain a metabolic fingerprinting of treated trout for two dyes, ie. MG and VPBO, compared to a control group. Our first objective was to conduct the data treatment for treated trout either by MG or VPBO but not to separate the two treatments to compare to controls in order to collect similar effects on the two dyes.

The data were processed for the three sets of matrices but are detailed here only for muscle and liver. In fact, data processing for plasmas did not lead to significant models. Nevertheless, PLS-DA for plasma is included in supplementary data Fig. S1. After a first preprocessing, the retention time alignment of all samples was not satisfactory due to a dense chromatographic region between 600 and 900 s. Change of the column type did not improve the quality of chromatograms. RT alignment was however improved by removing the masses higher than 750 Da. The data global processing detailed in Section 2.3.4 led to the selection of 422 features for muscle and 659

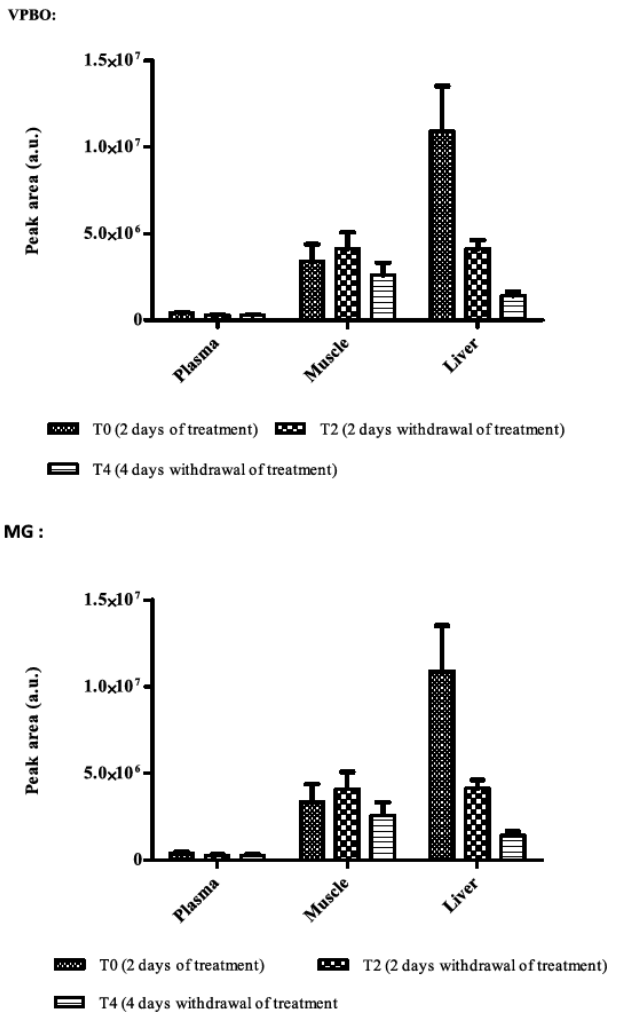


Fig. 3. Surface time profile of MG and VPBO in the different matrices during treatment and after end of treatment.

features for liver. Principal-components analysis (PCA) was first used to exploit the global dataset. The PCA carried out (see supplementary data Fig. S2), after correction of the batch effects and after the application of the filters on the ions, did not make it possible to discriminate the treated fish from the controls, whatever the matrix. On the other hand, the PCA confirmed that the corrections to normalize the batch effects made it possible to gather the QCs and, by extension, to state on the values of the conditions. The PCA released also the detection of intrinsic clusters or outliers. For muscle, the analysis revealed six outliers, three for malachite green and three for victoria pure blue BO. Partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) was then used to model the relationship between exposure conditions and LC-HRMS data. An initial model for each matrix was built on the basis on the global data set retained, the 422 features for muscle and the 659 features for liver. The models (Fig. 4) for muscle (Fig. 4a) and liver (Fig. 4b) clearly differentiate between group of controls and group of treated animals, with satisfactory descriptive and predictive values, for muscle: R^2X (cum) = 27.7%, R^2Y (cum) = 91.9%, Q^2Y (cum) = 82.8, and for liver: R^2X (cum) = 32.2%, R^2Y (cum) = 98.4%, Q^2Y (cum) = 91.2%. Although the group of animals treated with MG or VPBO were differentiated from the group of controls, no strict separation was observed between MG treatment and VPBO treatment, which could mean that similar effects could occurred on trout by the two dyes. For muscle, the model, after elimination of correlated ions with reviewing extracted ion chromatograms (EICs), revealed 11 features significantly different among the 3 groups, with a VIP value greater than 2.0.

Final PLS-DA of the muscle reduced data sets resulted in a model with good descriptive value (R^2X = 60.2%) and good prediction (Q^2Y = 83.1%) with a high degree of explained variation (a total R^2Y = 86.4%) modeled for the first 2 variables. For liver, a total of 17 ions significantly different between the treated group and the control group were selected to build the final model with satisfactory values: R^2X (cum) = 41.3%, R^2Y (cum) = 79.2%, Q^2Y(cum) = 76.4%. The graphs of final PLS-DA are presented in the supplementary data Fig. S3. The robustness of the models was assessed by using permutation tests and cross validation. Results from these tests were all satisfactory (data not shown), with 0% of false negatives for the cross validation. These validated models prove that high confidence can be accepted in the features retained as potential biomarkers of treatment. Nevertheless, it would be necessary to validate definitely the models by novel data sets of treated trout.

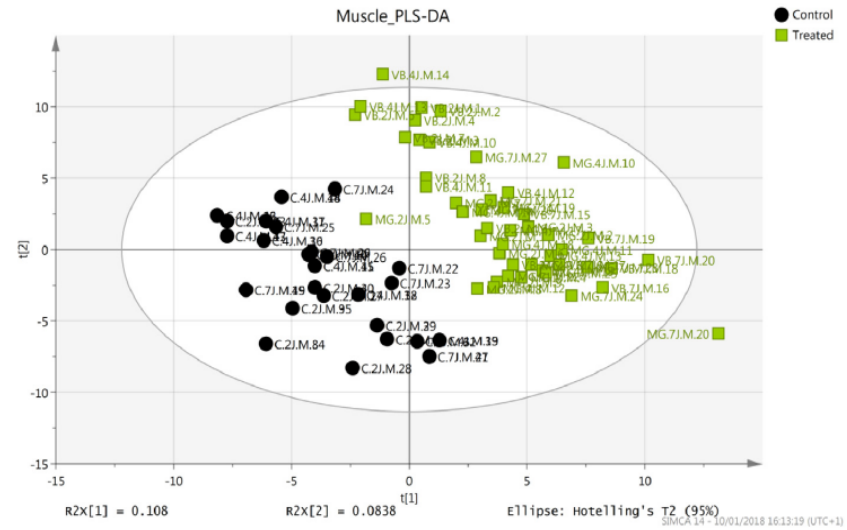
3.2.3. Potential biomarkers

The features selected according to the various criteria (final model, VIP values, EICs.) resulted in a list of potential biomarkers that were specifically examined. Firstly, in order to try to identify MG or VPBO related metabolites, probable phase I and phase II most common biotransformations pathways were studied. The formation of metabolites was investigated using MetWorks software. Starting from the parent compound mass (m/z = 329.2012 for MG and m/z = 478.3216 for VPBO), we screened a wide panel of Phase I and Phase II reactions based on mass shifts. The exact molecular masses of the corresponding molecular ions were compared with the experimental m/z values of the retained features to try to confirm the identity. For other potential biomarkers, tentative identification in the different databases assigning positive charge (molecular ion and probable adduct ions) and an experimental error lower than 5 ppm was carried out to find out probable elemental composition and associate mass error.

Most of retained features were in fact direct metabolites of MG and VPBO, and especially for the liver group. No common potential biomarkers were found sufficiently relevant between MG and VPBO treatment in the muscle group. In liver, some features could be common as a response of trout organisms after both treatments, but these ions are currently not characterized.

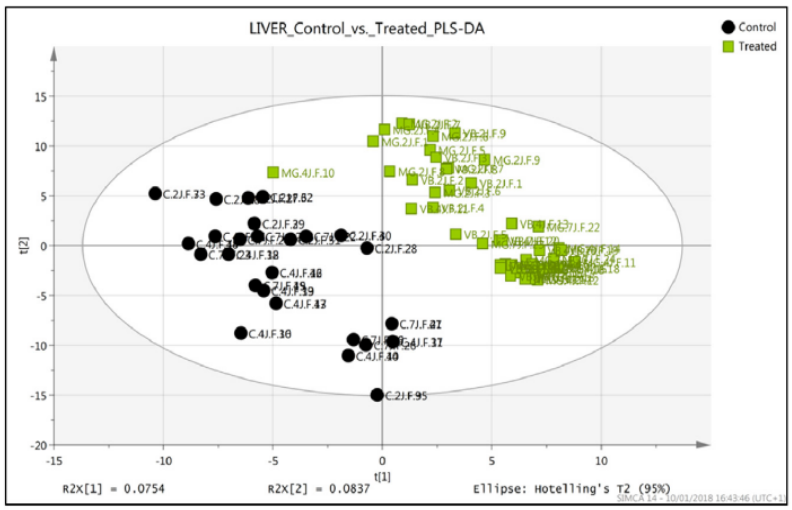
In muscle, as shown in Table 2a, more potential biomarkers are kept for MG than for VPBO, that suggest a greater effect on trout metabolism due to the MG treatment than to the VPBO treatment, in particular for down-regulated endogenous compounds. As an example, the surface time profile (supplementary data Fig. S4) of ion M533T401 reveals its impact after MG treatment over time compared to the control trout. Two direct major metabolites, LMG and *N*-desmethyl LMG that have already been identified a long time ago (Cha, Doerge, & Cerniglia, 2001), were also identified by the software. Other features could not be associated to putative compounds estimated by in silico programs except the feature M517T443 found in three databases. It is proposed as Taurodeoxycholic acid, a bile acid that appears to be affected by MG treatment being down regulated compared to the control group or to the VPBO treatment conditions. The proposed identification was confirmed thanks to the isotopic pattern (presence of one sulfur) and to the injection of a commercial standard solution of Taurodeoxycholic acid. The primary bile acids are synthesized in the liver from cholesterol. Then they are conjugated to either taurine or glycine. Altered bile acid pattern was shown to provide a rich source of biomarkers for early detection of specific liver injuries. Some bile acids were depicted as excellent biomarkers to detect illegal use of nitroimidazoles in pigs (Arias et al., 2016). In fish, especially zebrafish, the primary bile acid pathway was shown as affected by fipronil (Yan et al., 2016). Exposure of fish to wastewater effluent resulted in increases in plasma concentrations of xenometabolites as taurocholic acid (Al-Salhi, Abdul-

(a)



$R^2Y(cum) = 91.9\ \%$ $Q^2Y(cum) = 82.8\ \%$

(b)



$R^2Y(cum) = 98.4\ \%$ $Q^2Y(cum) = 91.2\ \%$

Fig. 4. PLS-DA score plot of metabolites profiles from samples belonging to control and treated (MG and VPBO) trout, for muscle (a) and for liver (b).

Sada, Lange, Tyler, & Hill, 2012). In this study, the down-regulation of the bile acid is induced by MG only. This was confirmed in our study, as shown in liver group of samples, and as displayed in supplementary data Fig. S5 (liver M517T443), where the bile acid was found but was not retained by the model, being probably excluded by a variation of the ion higher than 30% in the samples.

For VPBO in muscle, four ions, including two metabolites were retained as potential markers. Unfortunately no commercial standard solution for VPBO metabolites is available. But metabolites could be effectively confirmed by similar fragment ion source (347.1952 and 362.3658) between parent VPBO and the different metabolites. Deethylations of VPBO are not yet defined in the literature but dealkylations of some other triarylmethanes are known for a long time. The two endogenous compounds found as potential markers were down regulated by VPBO, as shown supplementary in supplementary data Fig. S4 for ion M506T837, but contrary to MG down-regulated ions, these two compounds, still unidentified, seem less polar than VPBO metabolites. Moreover the effect of treatment by VPBO is not lasting among the treatment period. After five days of treatment withdrawal, the peak area of M506T837 has a tendency to return to the basal level.

In liver, as shown in Table 2b, we firstly speculated possible metabolites according to the most common biotransformation pathways, the structure of the parent drug and similarly structured drugs, and possible metabolites were assumed for MG and VPBO, in particular a whole series of metabolites undergoing successive dealkylations. One doubt persists on M389T523 for MG that could be a glycine conjugate but mass error is high. However it should be a direct metabolite of MG because it was totally absent in the controls. For VPBO selected marker candidates, the leuco form was found whereas not found in muscle. Also following VPBO treatment, another bile acid, Glycodeoxycholate, was

Table 2a
Potential biomarkers in muscle between control trout and VPBO or MG treated trout.

MG muscle						
Feature	Trend regulation	*m/z*	Rt (min)	Formula	Mass error (ppm)	Putative metabolite
M331T764	up	331.2163	12.73	$C_{23}H_{26}N_2$	1.67	LMG
M317T687	up	317.2006	11.45	$C_{22}H_{24}N_2$	1.69	*N*-Desmethyl LMG
M434T653	up	434.2852	10.88	/	/	/
M517T443	down	517.3297	7.37	$C_{26}H_{45}NO_6S$	−1.50	Taurodeoxycholic acid (499.296753 + NH_3)
M560T401	down	560.2619	6.68	/	/	/
M533T401	down	533.3245	6.67	/	/	/
M531T395	down	531.3089	6.58	/	/	/
VPBO muscle						
Feature	Trend regulation	*m/z*	Rt (min)	Formula	Mass error (ppm)	Putative metabolite
M452T719	up	452.3052	11.18	$C_{31}H_{37}N_3$	1.92	*N*-Desethyl LVPBO
M393T548	up	393.2853	9.12	$C_{27}H_{27}N_3$	−1.66	*N*-Tri-desethyl VPBO
M506T837	down	506.4196	13.95	/	/	/
M396T674	down	396.3313	11.22	/	/	/

characterised for the M449T545 ion, and confirmed by a standard commercial solution by retention time and exact mass verification. Contrary to MG up-regulation on Taurodeoxycholic acid, VPBO effect seems to increase the level of Glycodeoxycholate. That means that the two triarylmethanes could act differently on the bile acid metabolism, and should presume to different action modes of the pharmacologically active drugs.

However, in the liver group three endogenous markers are assumed to be representative as a common action mode between MG and VPBO. They undergo up or down trend regulation by both MG or VPBO. As presented in supplementary data Fig. S4, the surface time profile of ion M717T443 is not marked clearly between treated MG or VPBO trout on the one hand and control trout on the other hand. These ions are still not identified, and could represent possible common relevant markers for forbidden triarylmethanes treatment, unfortunately their intensities in this study are rather weak.

4. Conclusion on interest of targeted and metabolomics approaches for dyes

In this overall study, we firstly developed and validated a targeted method in aquaculture products allowing the detection of 14 residues of dyes and the confirmation of 13 of them. The method encompasses an oxidation step running for 11 out of the 14 analytes to transform back the leuco-base forms, already known or not, into their parent forms in order to quantify only the parent form with CCα estimated below 0.5 µg kg^{-1} for the less sensitive dyes and below 0.1 µg kg^{-1} for the most sensitive. Only ethyl violet would require further development to be better stabilized during the analysis. This simple targeted method, involving an acetonitrile extraction and a short incubation for oxidation, is very sensitive and fast. As a primary strategy, the method could be easily applied for expanding the search for fraud in aquaculture using non-authorized dyes.

In a second strategy, the results of the metabolomics study

Table 2b
Potential biomarkers in liver between control trout and VPBO or MG treated trout.

MG liver						
Feature	Trend regulation	*m/z*	Rt (min)	Formula	Mass error (ppm)	Putative metabolite
M317T683	up	317.2007	11.38	$C_{22}H_{24}N_2$	1.56	*N*-Desmethyl LMG
M303T592	up	303.1850	9.87	$C_{21}H_{22}N_2$	1.81	*N*-Di-desmethyl LMG
M389T523	up	389.2328	8.71	$C_{25}H_{28}N_2O_2$	−27	Glycine conjugate-LMG
M331T762	up	331.2162	12.70	$C_{23}H_{26}N_2$	1.98	Leuco MG
M345T585	up	345.1955	9.75	$C_{23}H_{25}N_2O$	1.62	*N*-Hydroxyl MG
M730T410	up	730.3820	6.83	/	/	/
M669T405	up	669.3597	6.75	/	/	/
M720T539	up	720.4309	8.97	/	/	/
VPBO liver						
Feature	Trend regulation	*m/z*	Rt (min)	Formula	Mass error (ppm)	Putative metabolite
M480T795	up	480.3364	13.25	$C_{33}H_{42}N_3$	1.79	Leuco VPBO
M394T529	up	394.2269	8.81	$C_{27}H_{28}N_3$	1.84	*N*-Tri-desethyl VPBO
M452T715	up	452.3051	11.92	$C_{31}H_{37}N_3$	1.84	*N*-Desethyl LVPBO
M366T465	up	366.1957	7.74	$C_{25}H_{24}N_3$	1.68	*N*-Tetra-desethyl VPBO
M449T545	up	449.3477	9.07	$C_{26}H_{43}NO_5$	0.75	Glycodeoxycholic acid
M424T701	up	424.2739	11.67	$C_{29}H_{33}N_3$	1.74	*N*-Di-desethyl Leuco VPBO
Common						
Feature	Trend regulation	*m/z*	Rt (min)	Formula	Mass error (ppm)	Putative metabolite
M677T533	up	677.3625	8.87	/	/	/
M554T625	down	554.3235	10.41	/	/	/
M647T434	up	647.3778	7.23	/	/	/

presented in this article could also be considered to enlarge the targeted method. The comparison of fingerprints attached to treatments of fish by two dyes, malachite green (MG) and victoria pure blue bo (VPBO) led to interesting potential biomarkers. These two dyes are relatively close in their chemical structure both derived from the triarylmethanes. Then, it was assumed that a similarity in the fingerprints may arise between the two treatments. Results from PLS-DA statistical analyses permitted to constitute a final list of potential markers, especially in muscle and in liver, starting from numerous many spectrometric signals acquired by an LTQ-Orbitrap instrument. Direct exogenous metabolites of each triarylmethane like LMG or *N*-desethyl LVPBO could serve as biomarkers but for each treatment specifically. LMG is already considered as a relevant marker in the control methods for detecting illegal treatment. From our study, the metabolites of VPBO, as reduced form of leuco-bases and their desethyls, have been determined for the first time in muscle and liver of farmed fish. In addition, two endogenous biomarkers were formally identified as specific bile acids. But none of them carries a common effect on the metabolism of trout. Taurodeoxycholic acid appears to be down regulated by MG whereas glychodeoxycholate is up-regulated by VPBO. No common endogenous biomarker from dye treatment was identified by this study, but an effect of dyes on bile acid metabolism is suggested. For this reason, the second strategy proposed would be to modify and extend the targeted method with including these biomarkers. Then the targeted method would be adapted for screening the 13 targeted dyes but some biomarkers (endogenous and less selective as bile acids, or exogenous and more selective to VPBO treatment). The method could then serve for example in such project we would need to collect more data for evaluation of risk exposure. In this latter last case, the advanced targeted method could be proposed, not as a control method, but as a surveillance method. Before such implementation, further demonstration on routine positive samples would be necessary to confirm the VPBO metabolism and the bile acid biochemical modifications in farmed fish.

Declaration of Competing Interest

Estelle Dubreil and all the authors declare that they have no conflict of interest.

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.056.

References

Al-Salhi, R., Abdul-Sada, A., Lange, A., Tyler, C. R., & Hill, E. M. (2012). The xenometabolome and novel contaminant markers in fish exposed to a wastewater treatment works effluent. *Environmental Science and Technology, 46*(16), 9080–9088.

Andersen, W. C., Turnipseed, S. B., Karbiwnyk, C. M., Lee, R. H., Clark, S. B., Rowe, W. D., ... Miller, K. E. (2009). Multiresidue method for the triphenylmethane dyes in fish: Malachite green, crystal (gentian) violet, and brilliant green. *Analytica Chimica Acta, 637*(1–2), 279–289.

Andersen, W. C., Turnipseed, S. B., & Roybal, J. E. (2006). Quantitative and confirmatory analyses of malachite green and leucomalachite green residues in fish and shrimp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54*(13), 4517–4523.

Arias, M., Chevallier, O. P., Graham, S. F., Gasull-Gimenez, A., Fodey, T., Cooper, K. M., ... Elliott, C. T. (2016). Metabolomics reveals novel biomarkers of illegal 5-nitromimidazole treatment in pigs. Further evidence of drug toxicity uncovered. *Food Chemistry, 199*, 876–884.

Belpaire, C., Reyns, T., Geeraerts, C., & Van Loco, J. (2015). Toxic textile dyes accumulate in wild European eel Anguilla anguilla. *Chemosphere, 138*, 784–791.

Cha, C. J., Doerge, D. R., & Cerniglia, C. E. (2001). Biotransformation of Malachite Green by the fungus Cunninghamella elegans. *Applied and Environmental Microbiology, 67*(9), 4358–4360.

Culp, S. J., Beland, F. A., Heflich, R. H., Benson, R. W., Blankenship, L. R., Webb, P. J., ... Manjanatha, M. G. (2002). Mutagenicity and carcinogenicity in relation to DNA adduct formation in rats fed leucomalachite green. *Mutation Research – Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 506–507*, 55–63.

Culp, S. J., Blankenship, L. R., Kusewitt, D. F., Doerge, D. R., Mulligan, L. T., & Beland, F. A. (1999). Toxicity and metabolism of malachite green and leucomalachite green during short-term feeding to Fischer 344 rats and B6C3F1 mice. *Chemico-Biological Interactions, 122*(3), 153–170.

De Sotto, R., Medriano, C., Cho, Y., Seok, K. S., Park, Y., & Kim, S. (2016). Significance of metabolite extraction method for evaluating sulfamethazine toxicity in adult zebrafish using metabolomics. *Ecotoxicology and Environmental Safety, 127*, 127–134.

Dervilly-Pinel, G., Chereau, S., Cesbron, N., Monteau, F., & Le Bizec, B. (2015). LC-HRMS based metabolomics screening model to detect various β-agonists treatments in bovines. *Metabolomics, 11*(2), 403–411.

Doerge, D. R., Churchwell, M. I., Gehring, T. A., Pu, Y. M., & Plakas, S. M. (1998). Analysis of malachite green and metabolites in fish using liquid chromatography atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry, 12*(21), 1625–1634.

Dubreil-Chéneau, E., Pirotais, Y., Verdon, E., & Hurtaud-Pessel, D. (2014). Confirmation of 13 sulfonamides in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry for monitoring plans: Validation according to European Union Decision 2002/657/EC. *Journal of Chromatography A, 1339*, 128–136.

EFSA Contam- Malachite green in food (Scientific opinion). (2016). EFSA Journal, 14 (7), 4530.

European Community – Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (2002). Official Journal of the European Union, L221, 8–36.

Fallah, A. A., & Barani, A. (2014). Determination of malachite green residues in farmed rainbow trout in Iran. *Food Control, 40*(1), 100–105.

Giacomoni, F., Le Corguillé, G., Monsoor, M., Landi, M., Pericard, P., Pétéra, M., ... Caron, C. (2015). Workflow4Metabolomics: A collaborative research infrastructure for computational metabolomics. *Bioinformatics, 31*(9), 1493–1495.

Guitton, Y., Tremblay-Franco, M., Le Corguillé, G., Martin, J. F., Pétéra, M., Roger-Mele, P., ... Thévenot, E. A. (2017). Create, run, share, publish, and reference your LC–MS, FIA–MS, GC–MS, and NMR data analysis workflows with the Workflow4Metabolomics 3.0 Galaxy online infrastructure for metabolomics. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 93*, 89–101.

Hermo, M. P., Gómez-Rodríguez, P., Barbosa, J., & Barrón, D. (2013). Metabolomic assays of amoxicillin, cephapirin and ceftiofur in chicken muscle: Application to treated chicken samples by liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 85*, 169–178.

Hermo, M. P., Saurina, J., Barbosa, J., & Barrón, D. (2014). High-resolution mass spectrometry applied to the study of metabolome modifications in various chicken tissues after amoxicillin administration. *Food Chemistry, 153*, 405–413.

Hurtaud-Pessel, D., Couëdor, P., & Verdon, E. (2011). Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of dye residues in aquaculture products: Development and validation. *Journal of Chromatography A, 1218*(12), 1632–1645.

Khodabakhshi, A., & Amin, M. A. (2012). Determination of malachite green in trout tissue and effluent water from fish farms. *International Journal of Environmental Health Engineering, 1*(1), 51–56.

Knolhoff, A. M., Kneapler, C. N., & Croley, T. R. (2019). Optimized chemical coverage and data quality for non-targeted screening applications using liquid chromatography/high-resolution mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*.

Kovacic, P., & Somanathan, R. (2014). Toxicity of imine-iminium dyes and pigments: Electron transfer, radicals, oxidative stress and other physiological effects. *Journal of Applied Toxicology, 34*(8), 825–834.

Kuhl, C., Tautenhahn, R., Böttcher, C., Larson, T. R., & Neumann, S. (2012). CAMERA: An integrated strategy for compound spectra extraction and annotation of liquid chromatography/mass spectrometry data sets. *Analytical Chemistry, 84*(1), 283–289.

Libiseller, G., Dvorzak, M., Kleb, U., Gander, E., Eisenberg, T., Madeo, F., ... Magnes, C. (2015). IPO: A tool for automated optimization of XCMS parameters. *BMC Bioinformatics, 16*(1).

Máchová, J., Svobodová, Z., Svobodník, J., Piačka, V., Vykusová, B., & Kocová, A. (1996). Persistence of malachite green in tissues of rainbow trout after a long-term therapeutic bath. *Acta Veterinaria Brno, 65*(2), 151–159.

Peng, T., Royer, A. L., Guitton, Y., Le Bizec, B., & Dervilly-Pinel, G. (2017). Serum-based metabolomics characterization of pigs treated with ractopamine. *Metabolomics, 13*(6).

Reyns, T., Belpaire, C., Geeraerts, C., & Van Loco, J. (2014). Multi-dye residue analysis of triarylmethane, xanthene, phenothiazine and phenoxazine dyes in fish tissues by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 953–954*, 92–101.

Samuelsson, L. M., Björlenius, B., Förlin, L., & Larsson, D. G. J. (2011). Reproducible 1H NMR-based metabolomic responses in fish exposed to different sewage effluents in two separate studies. *Environmental Science and Technology, 45*(4), 1703–1710.

Smith, C. A., Want, E. J., O'Maille, G., Abagyan, R., & Siuzdak, G. (2006). XCMS: Processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Analytical Chemistry, 78*(3), 779–787.

Srivastava, S. J., Singh, N. D., Srivastava, A. K., & Sinha, R. (1995). Acute toxicity of malachite green and its effects on certain blood parameters of a catfish, Heteropneustes fossilis. *Aquatic Toxicology, 31*(3), 241–247.

Sun, H., Sun, N., Li, H., Zhang, J., & Yang, Y. (2013). Development of multiresidue analysis for 21 synthetic colorants in meat by microwave-assisted extraction-solid-phase extraction-reversed-phase ultrahigh performance liquid chromatography. *Food Analytical Methods, 6*(5), 1291–1299.

Tao, Y., Chen, D., Chao, X., Yu, H., Yuanhu, P., Liu, Z., ... Yuan, Z. (2011). Simultaneous determination of malachite green, gentian violet and their leuco-metabolites in

shrimp and salmon by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with accelerated solvent extraction and auto solid-phase clean-up. *Food Control, 22*(8), 1246–1252.

Tarbin, J. A., Chan, D., Stubbings, G., & Sharman, M. (2008). Multiresidue determination of triarylmethane and phenothiazine dyes in fish tissues by LC-MS/MS. *Analytica Chimica Acta, 625*(2), 188–194.

Thompson, H. C., Jr, Rushing, L. G., Gehring, T., & Lochmann, R. (1999). Persistence of gentian violet and leucogentian violet in channel catfish (ictalurus punctatus) muscle after water-borne exposure. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 723*(1–2), 287–291.

Turnipseed, S. B., Andersen, W. C., & Roybal, J. E. (2005). Determination and confirmation of malachite green and leucomalachite green residues in salmon using liquid chromatography/mass spectrometry with no-discharge atmospheric pressure chemical ionization. *Journal of AOAC International, 88*(5), 1312–1317.

Van Der Kloet, F. M., Bobeldijk, I., Verheij, E. R., & Jellema, R. H. (2009). Analytical error reduction using single point calibration for accurate and precise metabolomic phenotyping. *Journal of Proteome Research, 8*(11), 5132–5141.

Wu, Y., Bi, Y., Bingga, G., Li, X., Zhang, S., Li, J., ... Xia, X. (2015). Metabolomic analysis of swine urine treated with β < inf > 2 < /inf > -agonists by ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A, 1400*, 74–81.

Xu, Y. J., Tian, X. H., Zhang, X. Z., Gong, X. H., Liu, H. H., Zhang, H. J., ... Zhang, L. M. (2012). Simultaneous determination of malachite green, crystal violet, methylene blue and the metabolite residues in aquatic products by ultra-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatographic Science, 50*(7), 591–597.

Yan, L., Gong, C., Zhang, X., Zhang, Q., Zhao, M., & Wang, C. (2016). Perturbation of metabonome of embryo/larvae zebrafish after exposure to fipronil. *Environmental Toxicology and Pharmacology, 48*, 39–45.

Food Chemistry 306 (2020) 125539

Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem

Corrigendum

Corrigendum to "Dye residues in aquaculture products: Targeted and metabolomics mass spectrometric approaches to track their abuse [Food Chem. 294 (2019) 355–367]

E. Dubreil[a,*], S. Mompelat[a], V. Kromer[a], Y. Guitton[b], M. Danion[c], T. Morin[c], D. Hurtaud-Pessel[a], E. Verdon[d]

[a] ANSES Fougeres Laboratory, Unit of Analysis of Residues and Contaminants, CS 40608-Javene, F-35306 Fougeres, France
[b] LABERCA, Oniris, INRA, Université Bretagne-Loire, 44307 Nantes, France
[c] ANSES Ploufragan-Plouzane Laboratory, Unit of Viral Pathology in Fish, F-22440 Ploufragan-Plouzane, France
[d] ANSES Fougeres Laboratory, European Union Reference Laboratory for Antibiotic and Dye Residue in Food, CS 40608-Javene, F-35306 Fougeres, France

The authors regret that the Fig. 3 of the original paper (FC 294 (2019) 355–367) for MG was incorrect and corresponded to the same figure as for VPBO. The correct Fig. 3 is:

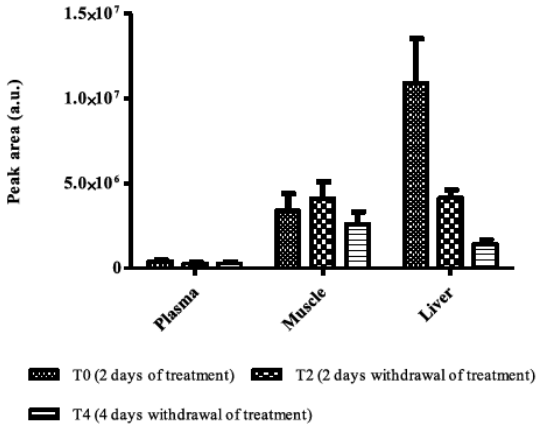
The authors would like to apologise for any inconvenience caused.

DOI of original article: https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.056
* Corresponding author.
E-mail address: estelle.dubreil@anses.fr (E. Dubreil).

https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125539

0308-8146/ © 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

VPBO:



MG:

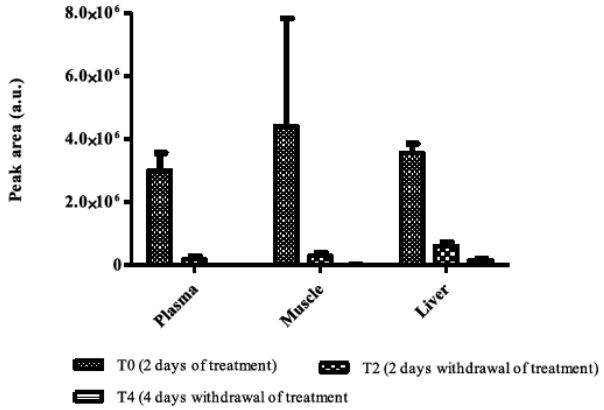


Fig. 3. Surface time profile of MG and VPBO in the different matrices during treatment and after end of treatment.

Article 2 : *In vitro* investigations of the metabolism of Victoria pure blue bo dye to identify main metabolites for food control in fish

1.1 Contexte

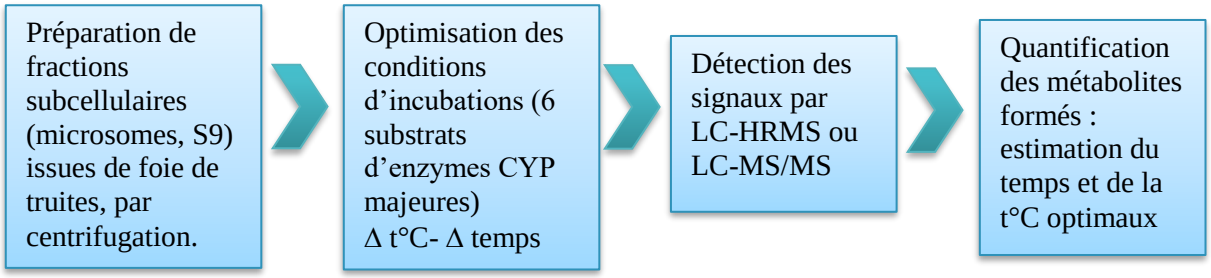
L'objectif de l'étude *in vitro* du projet Metacolor était d'explorer plus largement le métabolisme des TAMs, en conservant comme modèles VPBO et MG, afin de déterminer si l'approche méthodologique permettait d'imputer un ou plusieurs métabolites pertinents *in vitro* au métabolisme de la truite. Une équipe spécialisée en éco-toxicologie et compétente sur la préparation de fractions microsomales chez le poisson, le FFPW en République Tchèque, a été contactée. J'ai pu ainsi me former dans leur laboratoire sur la méthodologie de préparation des fractions subcellulaires et sur leur incubation. Plusieurs types de fractions subcellulaires (microsomes, fractions S9 de truite) ont pu être ramenées dans notre laboratoire, dont certaines induites par la β-naphtoflavone, un inducteur du CYP1A, afin de poursuivre les expérimentations.

1.2 Méthodologie et principaux résultats

Méthodologie de mise au point des conditions d'incubation

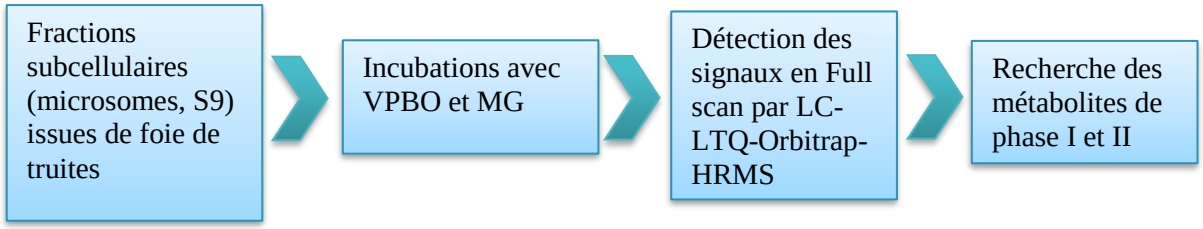
Les fractions sub-cellulaires ont été préparées par une technique de centrifugation différentielle (microsomes, S9) extraites de chaque truite. Les premières incubations tests réalisées au FFPW, avec des temps d'incubation de 30 min, ont été injectées pour analyse par LC-HRMS à mon retour au laboratoire et n'ont pas permis de détecter une formation de métabolites du MG ou du VPBO. Il a alors été nécessaire d'optimiser ces conditions. Profitant d'une méthode développée au laboratoire pour un projet de toxicologie, nous avons optimisé les conditions de température et durée d'incubation pour aboutir à la détection des métabolites.

Des substrats spécifiques des principales activités du CYP450 ont été utilisés: la phénacetine pour le CYP1A2, le diclofénac pour le CYP2C9, la méphénytoine pour le CYP2C19, le midazolam pour le CYP3A4, le bupropion pour le CYP2B6, et la chlorzoxazone pour le CYP2E1. Les métabolites associés ont été détectés et quantifiés, en faisant varier les temps d'incubation et les températures.



Méthodologie de recherche des métabolites formés :

En utilisant les conditions optimales (2 h à 20 °C), nous avons incubé MG et VPBO avec les fractions microsomales de truite et les fractions S9 induites avec la β-naphtoflavone puis analysé le surnageant dans un système LC-LTQ-Orbitrap-HRMS. Les co-facteurs appropriés ont été ajouté pour initier les réactions de phase I ou de phase II.



Principaux résultats :

Objectifs : appréhender les techniques de préparation microsomales, d'incubation. Rechercher les métabolites du VPBO formés *in vitro*, comparer le métabolisme à celui du MG, identifier un métabolite majeur

Mise au point des conditions d'incubation

-Observation d'une activité pour: CYP1A, CYP2-like et CYP3A-like, suite à la formation d'acétaminophène, OH-diclofénac, OH-midazolam
-Activité optimale pour 2h d'incubation et 20°C

Recherche des métabolites formés

-Optimisation d'une méthode générique de détection LC-HRMS
-Détection de 16 métabolites du VPBO formés par réactions de phase I, résultant en particulier de réactions avec le CYP1A.
-Aucun métabolite de phase II détecté.
-Le principal métabolite détecté, le dééthyl-VPBO, a été fragmenté par CID afin de déterminer sa structure chimique.

1.3 Conclusion

Cette étude a permis d'appréhender les différents types de fractions microsomales de poisson, depuis leur préparation jusqu'à leur utilisation pour initier une étude de métabolisme. L'objectif était d'obtenir des résultats de première approche *in vitro* pour l'étude du métabolisme du VPBO. Ces résultats suggèrent que la biotransformation de VPBO dans le foie de poisson est médiée par les enzymes CYP formant à la fois des métabolites désalkylés et des métabolites N-oxydés ainsi qu'une réduction de la double liaison conduisant à une leuco-forme, le dééthyl-leuco-VPBO. Le métabolite N-dééthylé de VPBO est celui retrouvé en plus forte intensité. MG suit une voie similaire *in vitro* pour la déalkylation, mais pas pour les métabolites N-oxydés. Cette étude est probante afin d'obtenir rapidement un aperçu du ou des métabolites majeurs pouvant être intéressants à confirmer lors d'une étude *in vivo* de persistance, afin de définir un ou des résidus marqueurs. Le dééthyl-VPBO a été retrouvé le plus intense, cependant le mécanisme de réduction de la double liaison a été peu détecté *in vitro*, alors que les leuco formes sont connues *in vivo* comme majeures pour MG et CV. Il nous est alors apparu nécessaire de proposer une expérimentation *in vivo* pour appréhender la pharmacocinétique du VPBO, ce qui a été l'objet du 3^{e} article.

Chemosphere 238 (2020) 124538

Contents lists available at ScienceDirect

Chemosphere

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chemosphere

In vitro investigations of the metabolism of Victoria pure blue BO dye to identify main metabolites for food control in fish

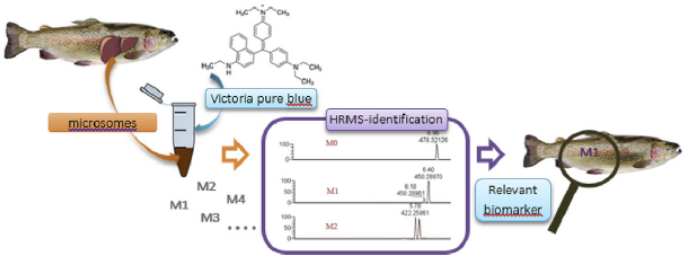
Estelle Dubreil [a, *], Luc Sczubelek [a], Viktoriia Burkina [b], Vladimir Zlabek [b], Sidika Sakalli [b], Galia Zamaratskaia [c], Dominique Hurtaud-Pessel [a], Eric Verdon [a]

[a] ANSES Fougeres Laboratory, European Union Reference Laboratory for Antibiotic and Dye Residue in Food, CS 40608-Javene, F-35306, Fougeres, France
[b] University of South Bohemia in Ceske Budejovice, Faculty of Fisheries and Protection of Waters Vodnany, South Bohemian Research Center of Aquaculture and Biodiversity of Hydrocenoses, Zatisi 728/II, 389 25, Vodnany, Czech Republic
[c] Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Molecular Science, P.O. Box 7015, SE-750 07, Uppsala, Sweden

HIGHLIGHTS

- The *in vitro* metabolism of Victoria pure blue BO (VPBO) dye was investigated.
- HRMS analysis shows that VPBO is metabolised into 16 metabolites.
- The CYP1 isoform is involved in VPBO metabolism.
- Deethyl-VPBO metabolite holds promise as a biomarker of exposure to VPBO in rainbow trout.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:
Received 22 May 2019
Received in revised form
25 July 2019
Accepted 7 August 2019
Available online 10 August 2019

Handling Editor: Jim Lazorchak

Keywords:
Dyes
Aquaculture
Chemical residues
LC-HRMS
Microsomes
Cytochromes P450

ABSTRACT

Although banned, dyes, such as Victoria pure blue BO (VPBO), are illicitly used in aquaculture to treat or prevent infections due to their therapeutic activities. The present study examined the formation of phase I and phase II metabolites derived from VPBO using trout liver microsomes and S9 proteins. The well-known malachite green (MG) dye was also studied as a positive control and to compare its metabolism with that of VPBO. First, we optimised the incubation conditions for the detection of VPBO and MG metabolites by studying the formation of cytochrome P450 (CYP) substrates. Using the determined conditions (2 h at 20 °C), we incubated VPBO with trout microsomal and S9 fractions induced with β-naphtoflavone, and analysed the supernatant in a LC-LTQ-Orbitrap-HRMS system. The *in vitro* assays led to the detection of 16 VPBO metabolites from Phase I reactions, arising in particular from reactions with CYP1A. No metabolites were detected from Phase II reactions. The main metabolite detected, deethyl-VPBO, was CID-fragmented to determine its chemical structure, and thus recommend a potential biomarker for the control of VPBO in farmed fish foodstuffs.

© 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

* Corresponding author.
E-mail address: estelle.dubreil@anses.fr (E. Dubreil).

https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124538
0045-6535/© 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Over the past 40 years, the aquaculture industry has grown exponentially in response to the increase in the world population, but also in response to consumer demand for fish-based foods and new food trends. Therefore, the maintenance of healthy fish-farming conditions is needed to minimise the risk of disease, reduce fish stress and minimise the environmental impact (Burka et al., 1997). Pharmacologically active substances such as antibiotics, pesticides or dyes are often used in fish farming. In the past, some triarylmethane dyes, such as malachite green (MG) and crystal violet (CV), were employed to prevent fungal infections and as antibacterial and antiparasitic agents. MG has been administered as prophylactic agent for both fish and fish oocytes for over 60 years (Foster and Woodbury, 1936). However, due their toxicity for human consumption (Schneider et al., 2004; Srivastava et al., 2004) and harmful effects on animals, dyes were subsequently banned and MG is in particular strictly regulated in the EU and the US, applying a policy of zero tolerance (WHO/FAO, 2015) with a detection capability required at 2 and 1 $\mu g\,kg^{-1}$ respectively. Although MG has been banned, it can still be detected in fish products imported from Asian countries (Gräslund and Bengtsson, 2001; Hashimoto et al., 2011; Tao et al., 2011; Fallah and Barani, 2014). MG, CV as well as brilliant green and their reduced (colourless) leuco-forms are currently targeted by analytical methods such as tandem mass spectrometry (MS/MS) to detect and quantify their residues in aquaculture foodstuffs (Andersen et al., 2015, 2018; Schneider and Andersen, 2015). Today, a new dye from the triarylmethane family, Victoria pure blue BO (VPBO), is suspected of use by the aquaculture industry in lieu of MG and CV (Tarbin et al., 2008; Reyns et al., 2014). For example, VPBO contamination was once reported by the European rapid Alert System for Food and Feed (RASFF-portal, European Commission) for fish imported from Vietnam (notification 2010.1372). In a recent report from the European Food Safety Authority (EFSA), VPBO was classified among the dyes for which a reference point for action (RPA) could be established in the near future, because it was assigned a toxicological screening value (TSV) of 0.0025 $\mu g\,kg^{-1}$ body weight per day (Penninks et al., 2017), due to its (potential) genotoxicity. Thus, there is a need to study the fate of dyes in fish tissues, including those of the triarylmethane-family compounds, as well as any possible toxic metabolites that have not been described so far.

For first intention metabolism studies on a chemical substance, *in vitro* experiments using sub-cellular fractions often deliver a snapshot of the potential metabolites that can help to understand the xenobiotic metabolism before carrying out *in vivo* studies. Xenobiotic metabolism reactions are categorised into Phase I and Phase II reactions. Phase I metabolism of numerous xenobiotics and endogenously produced compounds, including drugs and environmental pollutants can be studied using the cytochrome P450 (CYP) enzyme system, frequently responsible for Phase I oxidative metabolism. Phase II comprises conjugation or synthetic reactions (e.g., methylation, glucuronidation, sulfation), which generally lead to the increased solubility of xenobiotics (Guengerich, 1992). Thus, investigation of Phase I and II metabolic reactions is important in terms of fish health and welfare. *In vitro* incubations with sub-cellular fractions from fish are the first ecotoxicological approach to determine whether and how the xenobiotic is metabolised by Phase I enzymes (Vestergren et al., 2012; Ren et al., 2014; Zlabek et al., 2016) or Phase II enzymes or a combination of both (James et al., 2008; Shen et al., 2012; Ikenaka et al., 2013).

In vitro systems for determining main metabolites of pharmacologically active dyes were rarely employed. However, few experiments were conducted for MG incubation with microbial cultures (Singh et al., 1994; Cha et al., 2001) and for crystal violet (Bumpus and Brock, 1988). These studies released a first set of data about triarylmethanes metabolism complementary to the implementation of *in vivo* fish or mammalian studies (Plakas et al., 1996; Doerge et al., 1998; Culp et al., 1999b).

The aim of this study was to identify metabolites of VPBO and MG formed during Phase I and Phase II metabolism. To do so, we first determined the best incubation conditions for Phase I reactions to detect VPBO and MG metabolites. The potential metabolites of VPBO were identified by molecular separation and detection with liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (LC-HRMS) and by data mining using MetWorks® software. Finally, we proposed a chemical structure for the main metabolite detected.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and reagents

2.1.1. Metabolite investigations

MG oxalate salt (product number 46396), VPBO (product number 76773) and an internal standard (IS) for MG (MG-d_5) (product number 33945) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Quentin-Fallavier, France). The IS for VPBO (CV-d_6) (product number OP045) was purchased from Witega (Berlin, Germany). Stock solutions of MG and VPBO (1 mM) were prepared in 100% methanol (MeOH). Stock solutions were further diluted from 200 µM to 10 µM to obtain several concentrations ranging from 1000 nM to 50 nM. ISs were prepared at 70 nM for MG-d_5 and 30 nM for CV-d_6 in methanol. The cofactors dihydronicotinamide-adenine dinucleotide phosphate (NADPH), uridine 5′-diphosphoglucuronic acid (UDPGA), 3′-phosphoadenosine-5′-phosphosulfate (PAPS), L-glutathione reduced (GSH), S-adenosylmethionine (SAM) and alamethicin were purchased from Sigma-Aldrich. The positive controls for Phase II reactions were obtained from Chemservice (West Chester, PA, USA) for 7-hydroxycoumarin, and Sigma-Aldrich for apigenin and acetaminophen.

Acetonitrile (ACN), MeOH, ammonium acetate and formic acid were of HPLC grade. Water was purified using a Milli-Q system (Millipore, city, MA, USA).

2.1.2. Analysis of CYP activities

Phenacetin, diclofenac, bupropion, midazolam, acetaminophen, mephenytoin, chlorzoxazone, 4′-OH-diclofenac, 1′-OH-midazolam, OH-bupropion, OH-mephenytoin, 6-OH-chlorzoxazone, diclofenac-d_4 (IS), acetaminophen-d_4 (IS) were purchased from Sigma-Aldrich. The stock solutions of CYP substrates were prepared in DMSO and stored at −20 °C. The stock solutions of metabolites were prepared in MeOH and stored at −20 °C.

2.2. Fish

Rainbow trout of both sexes (n = 16) with length 30 ± 2.0 cm (mean ± standard deviation) and weight 373 ± 63 g, were purchased from a local commercial hatchery (Vodnany, Czech Republic). Fish were handled according to national and institutional guidelines for the protection of human and animal welfare. The fish were acclimated for 14 days and fed with commercial fish food (BioMar, Denmark) at 1% of body weight per day. To avoid effect of dietary bioactive compounds, fish were not fed last 24 h of acclimatization period. Additionally, β-naphtaflavone (BNF) was administered to four fish at 50 $mg\,kg^{-1}$ for 48 h. Fish were sacrificed according to the ethical rules of the EU-harmonised Animal Welfare Act of the Czech Republic. The unit is licensed (No. 53100/2013-MZE-17214) according to the Czech National Directive (Act No 246/1992 on the protection of animals against cruelty). Before

sampling fish hepatic tissues, fish were anesthetised in an ice bath and their spinal cords were cut immediately thereafter. Hepatic tissues were collected and stored at −80 °C before the extraction of microsomes and S9.

2.3. Preparation of microsomes and S9 fractions

Microsomal and S9 fractions were prepared from each individual fish by using the differential centrifugation method in two (for microsomes) or one (for S9) step(s) as described previously (Burkina et al., 2013). The prepared S9 fractions were only recovered from induced BNF fish whereas microsomal fractions were only recovered from non-treated fish by BNF.

Protein levels in prepared fractions were estimated spectrophotometrically using the method described in (Smith et al., 1985) with bovine serum albumin as a standard. Microsomes were suspended in buffer and stored at −80 °C. The microsomes were diluted in phosphate potassium buffer to a protein content of 10 mg mL^{-1} prior to use.

2.4. Measurement of CYP activity over time and temperature

Trout microsomes or S9 fractions were incubated with a cocktail of specific CYP substrates based on the methodology of Anthérieu et al. (2010). Some specific human substrates were used to evaluate CYP activity: phenacetin for CYP1A2, diclofenac for CYP2C9, mephenytoin for CYP2C19, midazolam for CYP3A4, bupropion for CYP2B6 and chlorzoxazone for CYP2E1. In the first experiment for enzymatic assessment over time, the cocktail of substrates was incubated for different times (30 min, 1 h, 2 h or 3 h) at 25 °C. Briefly, reaction mixtures (0.1 mL) contained 2 mg of microsomal or S9 proteins in an incubation medium of 50 mM phosphate potassium buffer (pH 7.4) and cofactor NADPH (1 mM). In the second experiment for enzymatic assessment over temperature, the cocktail of substrates was incubated for 2 h at different temperatures (12 °C, 17 °C, 21 °C, 25 °C, 37 °C). The reaction mixture was the same as described above. Once the set time had elapsed, the reaction was stopped by the addition of 100 µL ice-cold MeOH to prevent further metabolite formation and spiked with ISs (diclofenac-d_4 and acetaminophen-d_4) at 5 µM. Then, the supernatant was vortex-mixed and centrifuged at 10,000×*g* for 10 min. The clear supernatant was analysed using LC-LTQ-Orbitrap-HRMS for quantification of CYP activity by measuring metabolite formation: acetaminophen for the substrate phenacetin, 4′-OH-diclofenac for the substrate diclofenac, 4-OH-mephenytoin for the substrate mephenytoin, OH-midazolam for the substrate midazolam, OH-bupropion for the substrate bupropion and 6-OH-chlorzoxazone for the substrate chlorzoxazone.

These metabolite solutions were diluted in MeOH and phosphate buffer (50%/50%, v/v) to obtain freshly prepared mixture calibration standards including the ISs diclofenac-d_4 and acetaminophen-d_4.

2.5. In vitro identification of MG and VPBO metabolites

2.5.1. Identification of phase I metabolites

All assays were processed on ice and in the dark, because triarylmethanes are light-sensitive.

The incubation mixture contained, in the following order: the appropriate volume of phosphate buffer to obtain a final total volume of 100 µL, 2 mg mL^{-1} microsomal fraction or 1.42 mg mL^{-1} induced S9 fraction, substrate at 1 µM (VPBO or MG) and 1 mM NADPH to initiate the reaction. The incubation mixture was vortexed and incubated for 2 h at 20 °C. After 2 h, the reaction was stopped by the addition of 100 µL ice-cold MeOH spiked with the CV-d_6 IS at 10 µg $L^{-1}$and the mixture was vortexed and centrifuged at 10,000×*g* for 10 min. The supernatant was analysed using an LC-LTQ-Orbitrap-HRMS. Calibration standards were prepared between 50 nM and 1 µM with addition of the substrate (VPBO or MG positive control) after the end of the 2 h incubation.

Several negative controls with no substrate or with no microsomes or S9 protein fractions were also prepared to confirm the absence of interfering compounds and to identify any non-metabolically formed compounds. These three control incubations were necessary to confirm the quality of the process: (1) the “inactive microsomes” control is an incubation mix in which microsomes were pre-incubated at 60 °C for 45 min to inactivate them; (2)- the “blank” control is an assay without substrate (VPBO or MG) or cofactor (NADPH) added; (3) the “without cofactor” control is an assay to check that the enzymatic reaction is inactive. In addition, the MG substrate was used as positive control for Phase I investigations and also to compare Phase I metabolism of MG and VPBO.

2.5.2. Identification of phase II metabolites

The incubation mixture contained, in the following order: the appropriate volume of phosphate buffer to obtain final total volume of 100 µL, 1.42 mg mL^{-1} S9 fraction, alamethicin at 25 µg mL^{-1} on ice for 15 min for pre-incubation if UDPGA was included, substrate at 1 µM (VPBO or MG or positive control), mix composed of cofactors NADPH, GSHred, UDPGA, PAPS, SAM (1 mM, 5 mM, 2 mM, 0.1 mM, 0.1 mM respectively) or cofactors tested separately: GSHred to test the gluthatione-S-transferase reaction, UDPGA to test the UDP-glucuronyl-S-transferase, PAPS to test the sulfotransferase reaction, SAM to the test methyltransferase reaction. The incubation mixture was vortexed. After 3 h, the reaction was stopped by the addition of 100 µL ice-cold MeOH spiked with the CV-d_6 IS at 10 µg L^{-1}. When the reaction was completed, the mixture was vortexed and centrifuged at 10,000×*g* for 10 min. The supernatant was analysed using LC-LTQ-Orbitrap-HRMS.

For quality control, blank incubations without substrate and control samples without S9 proteins were also prepared. Positive controls were added at 50 µM for each of the four following reactions: 7-hydroxycoumarine was tested as substrate for glucuronidation, apigenine for sulfation, acetaminophen for glutathione conjugation and epinephrine for methylation.

2.6. Analysis instrument settings

2.6.1. Metabolite profile analysis

The decrease in the parent compound concentrations and the formation of metabolites were both measured. Metabolites were identified using the metabolite identification software MetWorks® 1.3.0. SP1. Software (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The analyses were conducted on the Thermo Fisher Accela LC system coupled to an LTQ-Orbitrap XL mass spectrometer (Thermo Fisher, Bremen, Germany). The reversed-phase LC separation was performed on a Phenomenex Luna C18 (2) column (Torrance, CA, USA) (150 × 2.0 mm, 3 µm) at 25 °C. Elution was performed by means of a gradient of ammonium acetate (10 mM) with 0.1% of formic acid (mobile phase A) and 100% acetonitrile (mobile phase B) at a flow rate of 0.2 mL/min. The gradient conditions were as follows: from 0 to 4 min, ramp up linearly from 98 to 2% of mobile phase A and hold for 8 min, then ramp back over 1 min to initial conditions and hold for 5 min to re-equilibrate the system. The injection volume was 10 µL. The mass spectrometer was operated with an electrospray ionisation probe in positive mode using the following source parameters: sheath gas flow rate of 30 arb; auxiliary gas flow rate of 10 arb; sweep gas flow rate of 2 arb; ion spray voltage of 5 kV; capillary temperature of 275 °C; capillary

voltage of 35 V; and tube lens of 90 V. The instrument was calibrated using the manufacturer's calibration solution, consisting of three mass calibrators (i.e., caffeine, tetrapeptide MRFA and Ultramark) to reach mass accuracies in the 1−3 ppm range. The instrument was operated in full-scan mode from *m/z* 100−1000 at a resolving power of 60,000 (full width at half maximum), allowing detection of VPBO and MG as their MG^+ or $VPBO^+$ positive ions, as well as detection of metabolite formation using MetWorks. Exact masses of the peaks detected by this software were extracted with a mass window of 5 ppm around the ionised precursor ion to confirm or reject their identity. The MG and VPBO recoveries were calculated as follows: $R = (ci \times 100)/c0$, where ci is the measured concentration of sample i, and c0 is the initial concentration. For confirmation of the identity of the major metabolite (deethylleuco), MS^2 exact mass fragmentation of the compound was performed in the LTQ-Orbitrap mass analyser. The energy for collision-induced dissociation (CID) was set at 35 eV, with an isolation width of *m/z* 1.

2.6.2. CYP activity assay

LC analysis was carried out on the same instrument as for metabolite investigation. However, the chromatographic separation was performed on a reversed phase HPLC column Agilent Zorbax RX-C8 (2.1 mm, 150 mm, 5 µm) equipped with a guard column Agilent C8 (12.5 mm, 2,1 mm, 5 µm). Chromatographic separation was carried out using two mobile phase preparations consisting of mobile phase (A) water with 0.1% formic acid, and mobile phase (B) pure analytical grade acetonitrile with 0.1% formic acid. The gradient conditions were as follows: from 0 to 6 min, ramp linearly from 98 to 10% of mobile phase A, then ramp over 0.1 min to initial conditions and hold for 6 min to re-equilibrate the system. The flow rate was set at 0.25 mL/min, the injection volume was 20 µL and the column oven was maintained at 25 °C. The mass spectrometer was operated with an electrospray ionisation probe in positive mode using the following source parameters: sheath gas flow rate of 55 arb; auxiliary gas flow rate of 10 arb; sweep gas flow rate of 2 arb; ion spray voltage of 4.5 kV; capillary temperature of 350 °C; capillary voltage of 35 V and tube lens of 90 V. The instrument was operated in full-scan mode from *m/z* 50−800 at a resolving power of 60,000 (full width at half maximum). The accurate mass of metabolites were theoretically calculated for their $[M + H]^+$ species and monitored at *m/z* 152.0706 for acetaminophen, *m/z* 256.10999 for OH-bupropion, *m/z* 235.1077 for 4-OH-mephenytoin, *m/z* 185.9952 for 6-OH-chlorzoxazone, *m/z* 342.0804 for OH-midazolam, *m/z* 312.0189 for 4′-OH-diclofenac, *m/z* 156.0957 for acetaminophen-d_4, *m/z* 300.0491 for diclofenac-d_4, with a mass tolerance of 5 ppm for quantification purposes.

3. Results and discussion

Here, we studied the *in vitro* biotransformation of VPBO and compared it with MG to identify potential metabolite biomarkers for this dye and structurally similar dyes. These biomarkers will be useful for developing a control strategy in view of establishing future RPAs for non-allowed pharmacologically active substances present in food of animal origin (EFSA CONTAM Panel et al., 2018).

3.1. Optimisation of mass spectrometry and liquid chromatography conditions

In this study, an analytical method was developed to detect VPBO and MG and their metabolites. First, for the mobile phase (pump A), a mixture of 10 mM L^{-1} ammonium acetate and 0.1% formic acid was selected. The pH of the mobile phase was adjusted to 3.5. For MG, whose pKa is 6.9, ionisation reaches 100% (Alderman, 1985). This mobile phase has already been tested in a previous study (Dubreil et al., 2019). The triarylmethane dyes or derivative-types are molecules with an apolar tendency (log P (MG) = 0.062 and estimated log P (VPBO) = 3.48 from Chemspider). Triarylmethanes and their metabolites (leucobases) are commonly eluted by using reversed-phases. We tested three hard-core shell columns (Phenomenex Kinetex C18 2.6 µm, Phenomenex Luna C18 3 µm, Agilent Zorbax-XDB-C8 5 µm), and the Luna column was ultimately chosen for its better response, larger number of points per peak, and also for its generation of slightly longer retention times for the parent compounds (MG and VPBO), which make it able to detect more polar metabolites with lower retention times. A gradient starting from 98% of aqueous mobile phase A and up to 98% of organic mobile phase B was selected for a satisfactory elution of the maximum amount of polar metabolites. In addition to chromatographic optimisation, HRMS conditions on an LTQ-Orbitrap system were optimised for the detection of dyes. Source electrospray conditions, such as capillary voltage, tube lens temperature and curtain gas were adjusted for the two parent compounds, i.e. MG and VPBO. Given that these parent compounds are naturally positively charged, detection was operated only in positive mode.

3.2. CYP activity

For the first time, a sensitive LC-HRMS approach was used to quantify the six CYP model-substrate metabolites in the incubation cocktail.

In the cocktail, the enzymes monitored correspond to CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4, CYP2B6 and CYP2E1, which were included because they are all major enzymes involved in mammalian metabolism (Lewis, 2004) and some are also expressed in fish. Fish CYP enzymes have begun to be studied more recently, particularly to understand the effects of aquatic pollution on various species, zebrafish being a particularly studied species. In fish, the most studied enzymes are CYP1A and CYP3A-like (Jönsson et al., 2010; Burkina et al., 2018). Trout may metabolise some mammalian substrates using the same enzymes as mammalian or via different CYPs (Connors et al., 2013).

Given that preliminary incubations (not described) in trout microsomes did not lead to the production of metabolites, we measured CYP activities to determine the best conditions for their production. The measures were carried out in basal enzyme activity conditions for microsomes that were not induced. To do so, we used a quantification method based on detection by MS that was developed earlier in the laboratory for a study on human cells (Ferron et al., 2016).

Among the six CYPs measured, we observed activity for three of them: CYP1A, CYP2-like, and CYP3A-like, following the formation of acetaminophen, OH-diclofenac, OH-midazolam, respectively (Fig. 1). The metabolite OH-bupropion, probably metabolised by CYP2-like in fish, was detectable, but the MS signal was too weak to be quantified. The quantification of metabolites shows that for CYP1A and CYP3A-like, maximum metabolite production was reached after 3 h of incubation with 700 and 1300 pmol of metabolites per mg of protein, i.e. 3.8 and 7.2 pmol min^{-1} mg^{-1} protein, respectively. However, the formation of OH-diclofenac, probably ensured by the CYP2-like enzyme also, was best detected after 2 h of incubation at a rate of 1000 pmol of metabolites per mg of protein, i.e. 8.3 pmol min^{-1} mg^{-1} of protein. The OH-diclofenac production rate decreased only after 2 h of incubation (see Fig. 1). An overall incubation time of 2 h was thus chosen for the study of dye metabolism, to observe the formation of potential (MG and VPBO) metabolites of interest and to avoid reaching a maximum concentration of product that would prevent any comparison

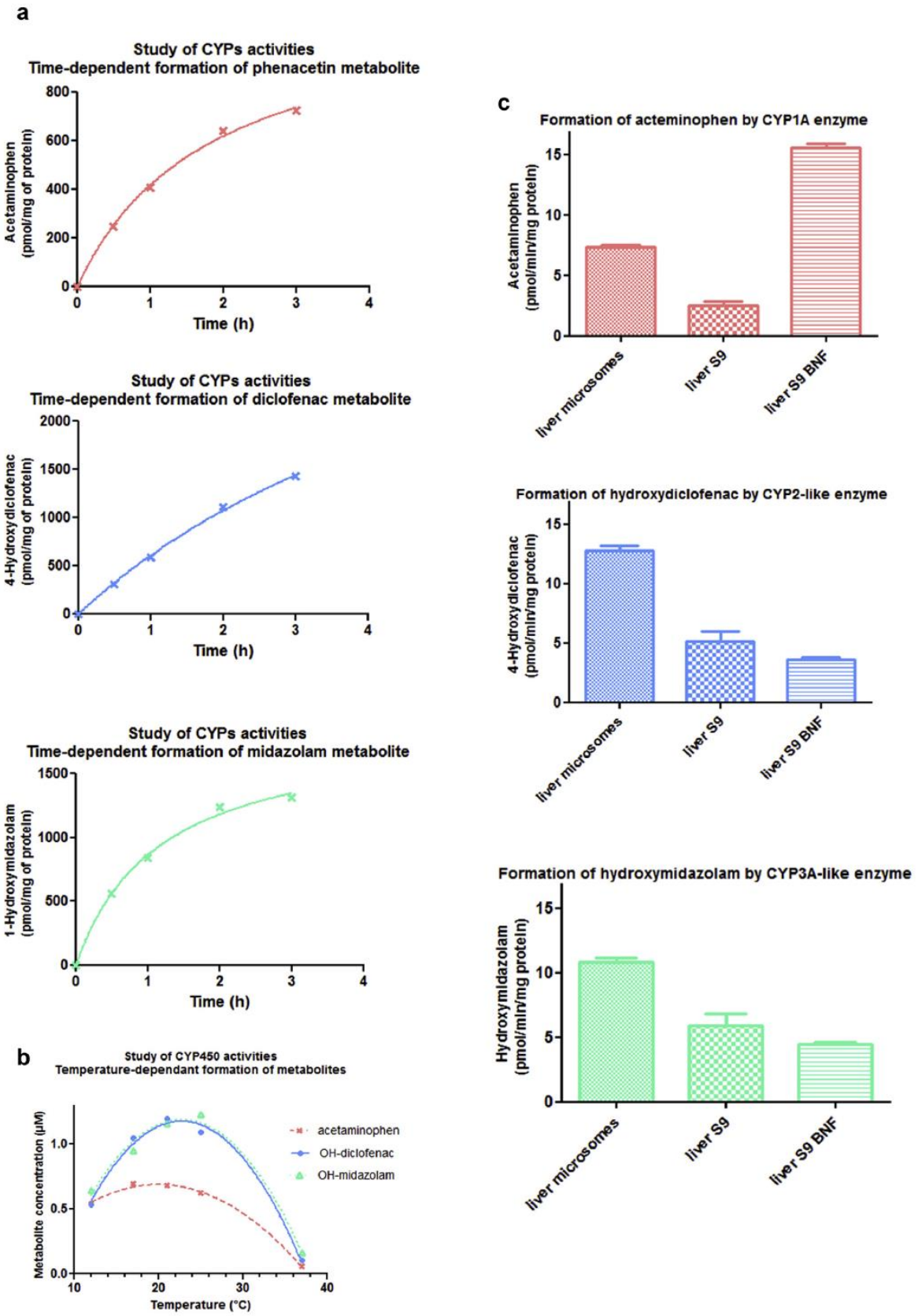


Fig. 1. Study of CYP activity by metabolites formation analysis for method optimisation. Fig. 1a Non induced microsomes at 2 mg mL^{-1}: [S] = 100 µM; [NADPH] = 1 mM; T° = 25 °C; pH7,4. Fig. 1b Non induced microsomes at 2 mg mL^{-1}: [S] = 100 µM; [NADPH] = 1 mM; Time = 2 h; pH7,4. Fig. 1c Metabolites concentration markers of CYPs activities in different liver subfractions.

between the tests. Once the optimal incubation time had been defined, the temperature conditions were studied. In the literature, the temperatures for incubation in trout enzymatic media range from 12 to 25 °C (Connors et al., 2013; Zlabek et al., 2016). Connors et al. (2013) performed the assays at the physiologically realistic temperature of 11 °C to describe the baseline activity of rainbow trout to biotransform selected pharmaceuticals to which it is environmentally exposed, without any specific enzyme inducer. Naab et al. (Nabb et al., 2006) also reported that trout NADPH-CYP reductase is reduced at temperatures lower than the optimal temperature of 25 °C. In our study, the optimal temperature for rainbow trout was between 20 and 25 °C, because we observed a high rate of production of acetaminophen, OH-diclofenac and OH-midazolam. These optimal conditions for CYP catalytic reactions were set up for further detection of VPBO and MG metabolite formation.

3.3. Phase I metabolism of VPBO

In fish, *in vitro* metabolism studies of xenobiotics using microsomal fractions are still relatively rare. As mentioned above, this study was not only conducted to obtain ecotoxicological data, but also to help develop a food control strategy with regard to dyes and to counteract any attempt of misuse of triarylmethanes or structurally related chemical substances. These new toxico-chemical data on dye metabolism may also be useful for increasing the knowledge on the fate of dyes in the environment and their bioaccumulation in fish following illegal treatments in aquaculture or following rejections from dye factories. For such Phase I metabolism studies, microsomal or S9 liver fractions, in contrast to cell cultures have the great advantage of being simple to purchase and to use, and are also easy to preserve. They can be readily employed to investigate the effects induced by chemical contaminants of emerging concern on aquatic organisms; especially for effects that will depend mostly on the biotransformation of the contaminant. Biotransformation generally leads to the formation of more polar metabolites, which can often be eliminated more rapidly than the parent compound (Holčapek et al., 2008). Thus, *in vitro* studies simulate the capacities and mechanisms of transformation of these metabolic products by the liver (Smith et al., 2012; Sakalli et al., 2018). The microsomes contain mostly CYP membrane-bound elements and may be preferable to S9 fractions for the studies of Phase I metabolism. S9 fractions, containing both cytosolic and microsomal enzymes, are generally more diluted and thus considered less active. Zhang et al. (2017) reported that it is necessary to use a larger amount of S9 protein than for microsomes, often five times, to achieve the same level of activity under similar incubation conditions.

3.3.1. Conditions for metabolite detection

Experiments were conducted on two sub-cellular fractions: microsomes and S9 fractions. Additionally, S9 fractions from fish previously injected with BNF (inducer of CYP1A) were used in the present study (Lněničková et al., 2018). Results were acquired for both sub-cellular fractions, giving more information on the effect of CYP1A, by comparing the intensities of the peaks of different metabolites in microsomes and S9 fractions induced with BNF (Table 1).

Detection and identification of *in vitro* metabolites were based on the presence of their protonated molecules $[M+H]^+$ or directly charged M^+ as for the VPBO parent molecule (Villar-Pulido et al., 2011).

First, blank controls were examined to ensure the validity of the results. Heating the liver fraction enzymes to 60 °C or incubating enzymes in the absence of NADPH did not produce any metabolites nor did it produce a decrease in the parent compound VPBO. This result suggests that VPBO is sensitive to Phase I enzymatic transformations in the presence of a metabolic biotransformation cofactor, and that no key factor other than an enzymatic reaction is needed to induce metabolism. In addition, recovery of 65% was obtained for VPBO in induced S9 fractions, suggesting that 35% of VPBO was metabolised following incubation, whereas 50% of MG was metabolised (Table 2). In addition, the recovery was assessed at 30% for VPBO in microsomes (supplementary data, not assessed for MG), almost the same results compared to S9 fractions. No metabolites were detected in incubations without cofactor. Blank samples without cofactor NADPH also confirmed that samples were not contaminated.

3.3.2. Phase I metabolites and comparison with MG metabolism

Several types of phase I metabolic reactions were identified during the incubation of VPBO, either with trout microsomes or S9 fractions. The different biotransformations are listed in Table 1 together with their associated molecular formulae, mass error between measured and calculated mass, retention times and intensity of the peaks obtained in the microsome or S9 incubation environments. The extracted ion chromatograms of proposed metabolites are shown in Fig. 2.

3.3.2.1. Deethylation series. The incubation of VPBO with trout microsomes resulted in the formation of successive deethylation. All metabolites M1 to M5 were detected in positive mode due to the presence of an amino group in their structure already positively charged. Polarities of the deethyl metabolites increased with the number of deethylations, such that retention time was the shortest for the quintuple N-deethyl-VPBO (M5). The first intense peak was observed for the N-deethylation reaction (M1: *m/z* 450.2903), with an intensity in count per second (cps) three times higher in the S9 incubation medium than in the microsome incubation medium. This result suggests that deethyl-VPBO is not a chemical transformation product, but that the metabolic reaction is carried out at least partly by CYPs. The single deethylation led to isomers (see §3.5) with a difference in intensity between their respective peaks. Further deethylations up to the quintuple deethyl-VPBO (M2-M3-M4-M5) were detected and monitored in the incubation medium with the intensity of the respective recorded peaks logically decreasing as the number of deethylations increased. A metabolite corresponding to a single demethylation, with a relatively weak peak, was also observed as a dealkylation reaction (M6: *m/z* 464.3053) as well as a deethyl-demethyl metabolite (M7: *m/z* 436.2746).

Proposed structures for metabolites are shown in Fig. 3 representing the putative metabolic pathway for VPBO. The same sequential dealkylation was first described by Culp et al. (1999a), in an *in vivo* study in rodents. That study predicted the oxidative MG pathway by the sequential N-demethylation of the dye to yield mono-, di-, tri-, and tetra-demethyl derivatives. In our experiments, MG was used as positive control for Phase I reactions. We assumed that Phase I reactions for MG following *in vitro* incubation would be successful in light of the study by Cha et al. (2001) in which a microsomal fraction of *C. elegans* was cultured with MG, and indicated that CYP is involved in the production of N-demethylated derivatives. In our trout microsomal or S9 incubations, up to three demethylations were successfully monitored (Supplementary Table 1) – as reported by Cha et al. (2001) although a tetra-demethyl-MG has also been observed *in vivo* (Culp et al., 1999a).

3.3.2.2. Oxidation series. The N-oxidation reaction of VPBO resulted in five derivatives eluted at 6.0 and 6.2 min for oxidised isomers M8, and then for M9, M10, M11 which are oxidative metabolites

Table 1
In vitro LC-Orbitrap-HRMS data of Victoria pure blue bo and its metabolites in trout.

Compound ID	Reaction	Molecular Formula	Calculated mass	Measured mass	Error (ppm)	RT (min)	Intensity [cps] Microsomes	Intensity [cps] Induced S9
M0	VPBO	**$C_{33}H_{40}N_3$**	**478.3216**	478.3215	0.2	6.9	189198482	316747654
M1	N-deethylation	$C_{31}H_{36}N_3$	450.2903	450.2898	1.1	6.3	21942897	70692673
				450.2899	0.9	6.1		13086030
M2	double N-deethylation	$C_{29}H_{32}N_3$	422.2590	422.2586	0.9	5.9	28852160	22453456
				422.2585	1.2	5.8		24176979
M3	triple N-deethylation	$C_{27}H_{28}N_3$	394.2277	394.2274	0.8	5.4	6716069	9538127
				394.2274	0.8	5.3		821764
M4	quadruple N-deethylation	$C_{25}H_{24}N_3$	366.1964	366.1961	0.8	5.0	642681	1050160
M5	quintuple N-deethylation	$C_{23}H_{20}N_3$	338.1651	338.1648	0.9	4.7	49310	392221
M6	N-demethylation	$C_{32}H_{38}N_3$	464.3059	464.3053	1.3	6.7	530412	1557917
M7	deethylation + demethylation	$C_{30}H_{34}N_3$	436.2746	436.2742	0.9	6.2	95237	147517
M8	oxidation	$C_{33}H_{40}N_3O$	494.3165	494.3161	0.8	6.2	321539	868052
				494.3161	0.8	6.0		496954
M9	deethylation + oxidation	$C_{31}H_{36}N_3O$	466.2852	466.2847	1.1	5.9	221919	712927
						6.1		198557
M10	double deethylation + oxidation	$C_{29}H_{32}N_3O$	438.2539	438.2537	0.5	5.6	151577	277638
M11	triple deethylation + oxidation	$C_{27}H_{28}N_3O$	410.2226	410.2222	1.0	5.1	41240	192955
M12	oxidation + deshydrogenation	$C_{33}H_{38}N_3O$	492.3008	492.3003	1.0	5.5	82405	360567
M13	deethylation + oxidation + deshydrogenation	$C_{31}H_{34}N_3O$	464.2695	464.2687	1.7	5.2	ND	184850
M14	double deethylation + oxidation + deshydrogenation	$C_{29}H_{30}N_3O$	436.2382	436.2375	1.6	5.9	16113	277094
M15	triple deethylation + oxidation + deshydrogenation	$C_{27}H_{26}N_3O$	408.2069	408.2069	0	5.6	68245	219607
M16	deethylation + double bound reduction	$C_{31}H_{38}N_3$	452.3059	452.3055	0.9	10.2	ND	545914

Table 2
VPBO and MG recoveries after incubation with trout S9 fractions.

Assay	VPBO	MG
Phase I reactions	65 ± 2%	52 ± 2%
Phase I + II reactions	66 ± 1%	ND
Phase II reactions	102 ± 12%	ND
Phase I + II (GSH conjugation)	59 ± 1%	159% [a]
Phase II (GSH conjugation)	97%	ND
Phase I + II (UDPGA conjugation)	40%	67 ± 17%
Phase II (UDPGA conjugation)	89%	ND
Phase I + II (PAPS conjugation)	70%	50%

[a] High recovery achieved due to matrix effect.

that undergo successive deethylations at earlier retention times of 5.9 min, 5.6 and 5.1 min, respectively. For isomers M8 (*m/z* 494.3165), the +16 Da shift can surely be attributed to the oxidation of a nitrogen atom, probably on a N-diethylaniline moiety for the most intense peak at 6.2 min, and on the N-ethylnaphtylamine moiety for the less intense peak at 6.0 min. The M8 isomers also gave more intense peaks in the induced S9 incubation medium compared with the microsome incubation medium. However, the principal isomer M8 was detected once in a blank sample without addition of the NADPH cofactor, specifically in the sample prepared with the S9 fraction. Further, it was not detected in the inactive control sample. This appears to suggest that the oxidation reaction can also occur in some other (bio)chemical conditions if sufficiently oxidative.

The same observation was made for M9 (*m/z* 466.2852), when VPBO undergoes oxidation and deethylation. This metabolite was also observed in a blank sample without addition of the NADPH cofactor. The further double deethylation (M10, *m/z* 438.2539) and triple deethylation (M11, *m/z* 410.2226) associated with oxidation were specifically tracked in microsomes and in S9 incubation media. Another type of reaction was observed: a dehydrogenation reaction associated with oxidation generated a Δ *m/z* +14 compared with VPBO. This mass shift can be attributed to N-hydroxylation following dehydrogenation by formation of a double bond between nitrogen and a methyl group at the end an oxime ($+O\text{-}H_2$) (Holčapek et al., 2008). This reaction may occur preferably on the N-deethylaniline to form metabolite M12 (*m/z* 492.3008). A similar process of deethylation can be applied to M12 to form M13 (*m/z* 464.2695), M14 (*m/z* 436.2375), and M15 (*m/z* 408.2069).

The process of N-oxidation for MG has been described by Doerge et al. (1998). Culp et al. (1999b) also proposed a mechanism for the metabolism of MG and leuco-malachite green that can be oxidised to intermediate compounds that react with DNA to generate liver- and thyroid-DNA adducts. In our *in vitro* study, either with microsomes or S9, none of these oxidised metabolites of MG were detected.

3.3.2.3. Double bond reduction series. The double bond reduction is the first well-known metabolic reaction for triarylmethanes, such as MG or CV. This redox reaction was for instance observed as a biotransformation *in vitro* forming leuco-MG in the fungus *C. elegans* (Cha et al., 2001). The authors also demonstrated the involvement of CYPs in this conversion. The double bond reduction has also been depicted many times in edible fish tissues where the leuco-form may accumulate and persist for several months longer than parent compound (Plakas et al., 1996; Thompson et al., 1999; Turnipseed et al., 2005). We assumed that the same reaction can occur for VPBO on the double bond between the two aryl groups. In addition, this reaction was previously observed in our laboratory during some metabolomics studies in trout (Dubreil et al., 2019). Thus, we reviewed all our chromatograms for peaks corresponding to the leucobase of VPBO of *m/z* 480, as well as the leucobases of the N-deethylated metabolites. First, we observed that VPBO leuco-metabolites were absent from all standard and control samples, whereas the reduced leuco-form of MG can occur in solution and was detected in negative controls (inactivated by temperature and without NADPH) and in standards in solution. In incubation media with S9 fractions, one leuco-metabolite of VPBO was recorded, the metabolite M16 (*m/z* 452.3055) corresponding to the leuco-deethylated VPBO. M16 was only detected in induced S9 media, not with microsomes nor in controls. Therefore, we assume that leuco-VPBO metabolites occur less spontaneously than leuco-MG, which also indicates the prominent role of CYP enzymes for the

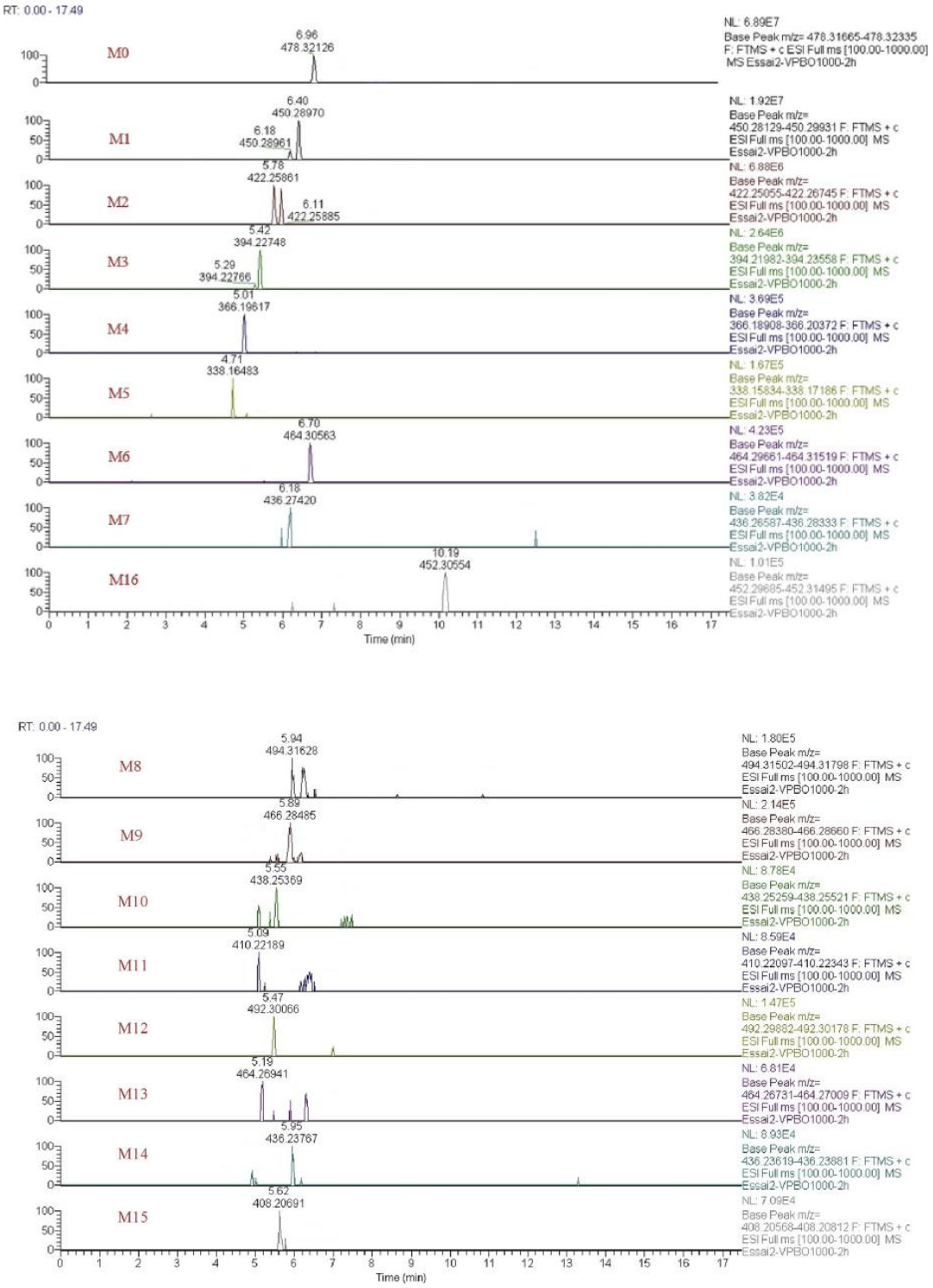


Fig. 2. The extracted ion chromatograms ofVPBO metabolites in trout S9 supernatant after 2 h of incubation.

conversion.

3.3.3. *Phase II metabolism*

In vitro incubation systems with S9 fractions are still used compared with hepatic cell lines to study the reactions of Phase II metabolism in humans (Negreira et al., 2015; Richter et al., 2017); however, these systems are rarely used in fish (Connors et al., 2013). An incubation period of 3 h, based on the methodology of Negreira et al. (2016) was considered sufficient to ensure the formation of conjugated metabolites, in particular when a Phase I reaction must

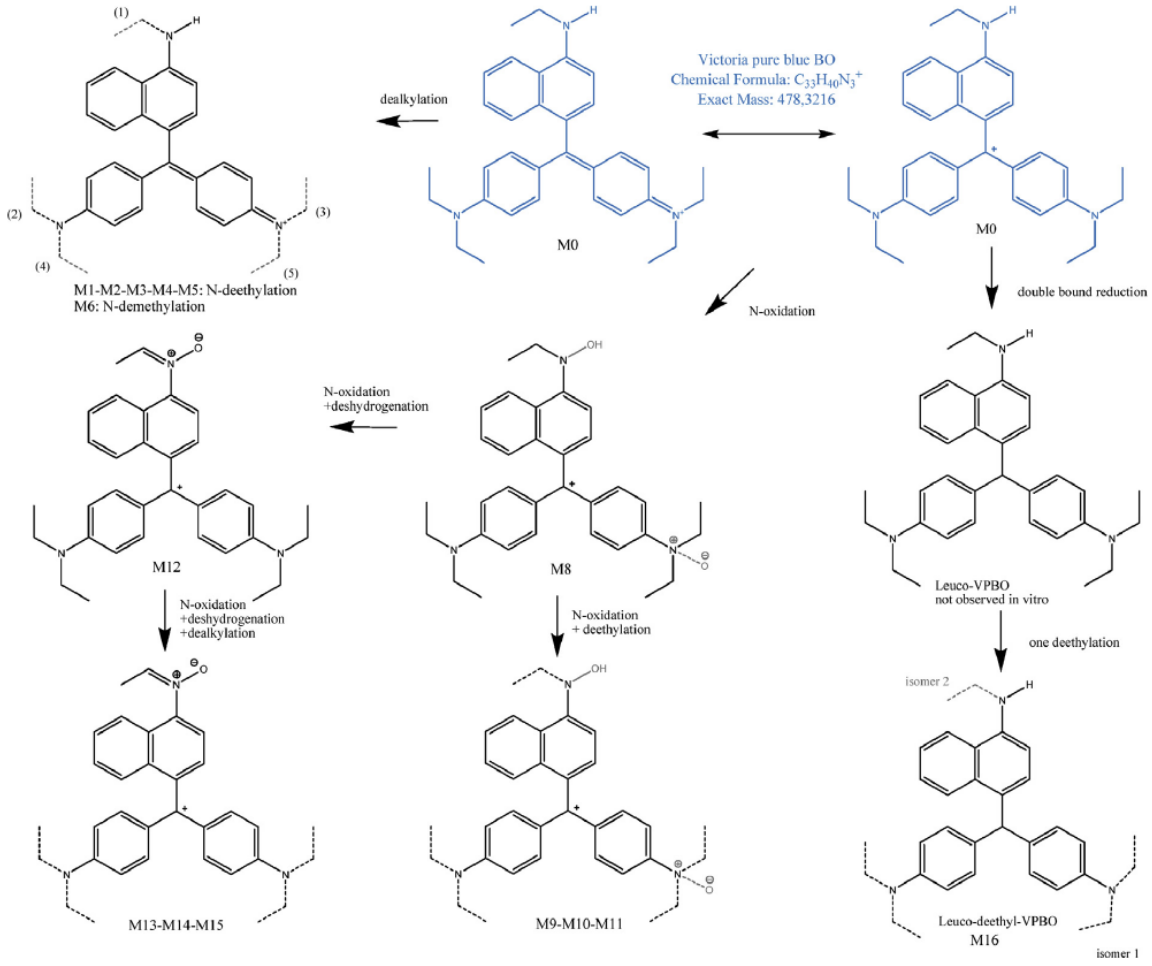


Fig. 3. Putative metabolic pathway of VPBO.

occur just prior to conjugation. Four Phase II activities were tested by incubation with specific substrates: 7-hydroxycoumarine for glucuronidation, apigenine for sulfation, acetaminophen for glutathion conjugation and epinephrine for methylation.

Regarding recoveries, incubation of VPBO or MG substrates with Phase II enzymes separately or simultaneously with Phase I enzymes did not lead to their depletion compared with incubation with only NADPH (see Table 2). Recoveries show that no supplementary depletion of VPBO occurred when adding only one Phase II reaction (recovery of 40% for phase I + glucuronidation, recovery of 59% for phase I + gluthatione conjugation, recovery of 70% for phase I + sulfotransferase conjugation) or simultaneously (recovery of 66%) compared with Phase I reactions only (recovery of 65%). Also, no Phase II conjugates of VPBO or MG were detected in the Phase II experiments. Further, the metabolite of apigenine produced by SULTs (apigenine-7-sulfate), of acetaminophen produced by GSH red (acetaminophen-glutathione) and of 7-hydroxycoumarine produced by UDPGA (7-hydroxycoumarine glucuronide) were detected in the positive control sample, demonstrating good experimental design and suggesting that the three conjugation reactions (sulfation, glutathione, glucuronidation) did not occur for VPBO, unless Phase II metabolites for VPBO cannot be detected by our method or that our method is not sensitive enough. However, the methylation of epinephrine did not lead to the emergence of the o-methylated metabolite metanephrine.

3.4. Confirmation of major metabolite identity

The objective of this in *vitro* study on a triarylmethane derivative was to investigate VPBO metabolism. Incubations with liver microsomal or S9 fractions showed some similarities between the known metabolism of MG and that of VPBO, particularly N-oxidative dealkylation and N-oxidation. The CYP-dependent metabolism, particularly CYP1A, appears to be involved in these reactions as well as in the double bond reduction reaction. Inducing CYP1A with the specific inducer BNF led to a higher production of metabolites (Table 1). On the other hand, the double bond reduction appears to be more difficult to induce *in vitro* for VPBO than for MG.

In this study, a total of 16 VPBO metabolites were detected *in vitro* on trout microsome and S9 fractions. The proposed major metabolic pathway of VPBO is shown in Fig. 3. In regard to our objective of compiling enough metabolism information to propose a potential biomarker for the control of VPBO in farmed fish, we focused on the main metabolite deethyl-VPBO, the one detected with the greatest peak intensity. Our previous metabolomic study including an experiment on trout led to the formation of the deethyl-leuco metabolite after *in vivo* treatment with VPBO, not

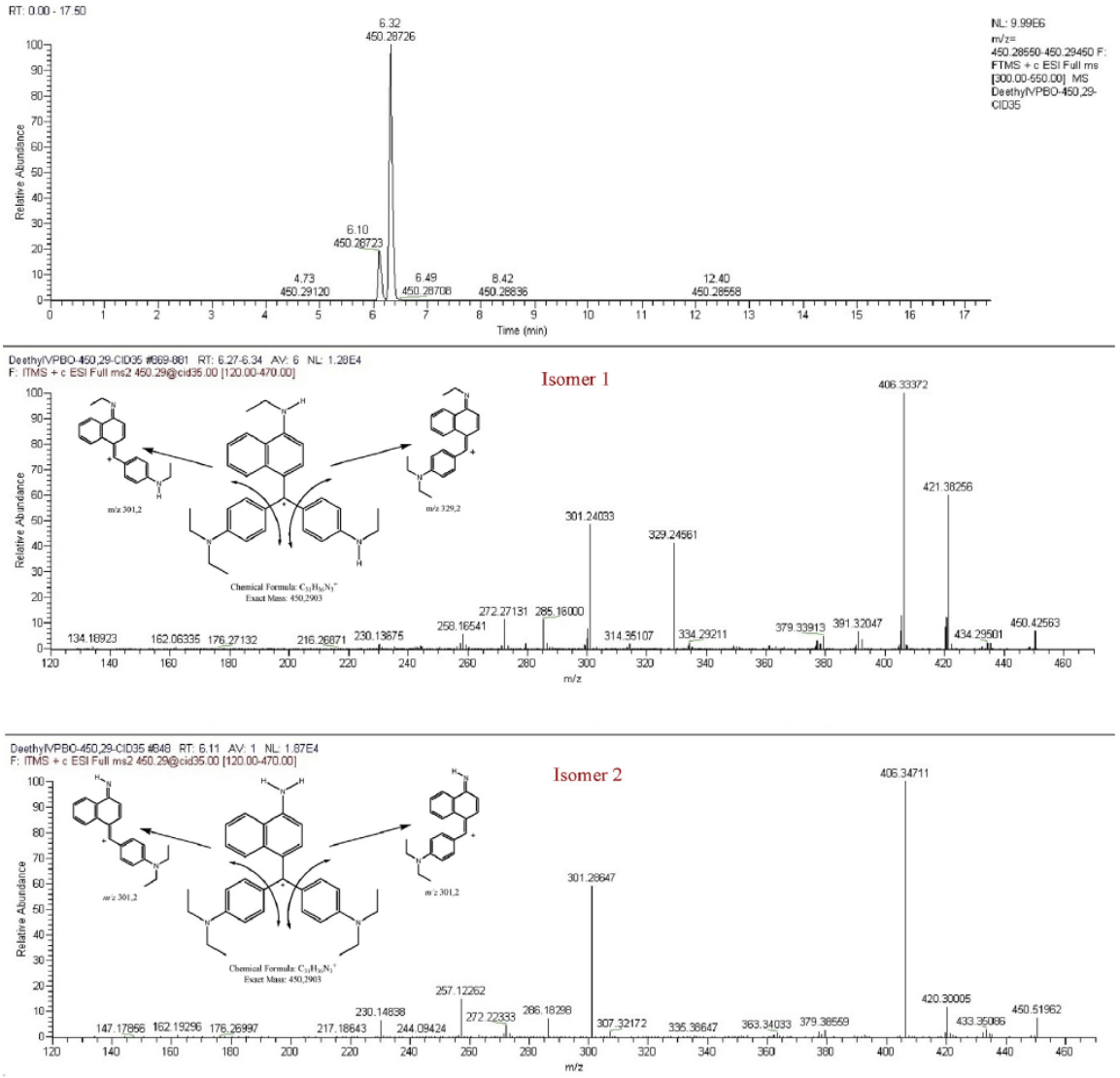


Fig. 4. Proposed structure of deethyl VPBO, XIC and obtained MS/MS CID spectra.

just the deethyl form (Dubreil et al., 2019). This result appears to suggest that deethyl-leuco VPBO is very easily produced in fish, but not in *in vitro* microsomes. In S9 induced fractions, the metabolic deethylation of VPBO led to two positional isomers of similar mass (*m/z* 450.2903) that were further fragmented by CID in the LC-LTQ-Orbitrap-HRMS. Upon deethyl-VPBO fragmentation, isomer 1 produced four fragments (*m/z* 421.3826; 406.3337; 329.2456; 301.2403), whereas isomer 2 produced only two fragments (*m/z* 406.3471; 301.2864). The two fragmentation patterns and proposed structures for deethyl-VPBO isomers are shown in Fig. 4. In addition, a similar CID fragmentation of the parent compound VPBO (data not shown) showed that the most intense isomer (isomer 1, see Fig. 4) of deethyl-VPBO had a similar fragmentation pattern as the ion *m/z* 329.3 from VPBO fragmentation. Given that the fragment ion *m/z* 329.3 is not subject to deethylation, the modification of deethylation for isomer 1 of deethyl-VPBO was carried out on a neutral fragment, i.e. N-deethylaniline. For isomer 2 (see Fig. 4), deethylation occurred on N-ethylnaphtylamine, because fragmentation led to ion *m/z* 301.2 and not ion *m/z* 329.3.

4. Conclusion

Here, we developed an *in vitro* experiment to study the biotransformation of VPBO and MG in fish liver sub-cellular fractions. Our results suggest that the biotransformation of VPBO in fish liver is mediated by CYP enzymes forming both dealkylated metabolites and N-oxidated metabolites as well as a double bond reduction leading to a leuco-form, the deethyl-leuco-VPBO. The single N-deethylation led to a major intense metabolite in this *in vitro* study. In view of these results, the N-deethylated metabolite of VPBO should be a relevant biomarker after a fish treatment bu VPBO and should be included in analytical methods for control of fish foodstuffs. In comparison, the well-known dye of the triarylmethane family, i.e. MG, follows a similar pathway *in vitro* for dealkylation, but not for the N-oxidated metabolites. Furthermore, MG forms several leuco-(dealkylated) metabolites in contrast with VPBO that forms none. The present study demonstrates that CYP1A can be involved in biotransformation of MG and VPBO in fish liver sub-cellular fractions. This study generated the first set of data on

metabolism of a pharmacologically active dye, VPBO, which can be integrated in the chemical residue control for the food safety of aquaculture products in the near future.

Conflicts of interest

Estelle Dubreil and all the authors declare that there is no conflict of interest in regard to their work presented here.

Acknowledgements

This work was financed by the European Union Reference Laboratory for Antibiotic and Dye Residue in Food at the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (ANSES).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124538.

References

Alderman, D.J., 1985. Malachite green: a review. J. Fish Dis. 8, 289–298.
Andersen, W.C., Casey, C.R., Schneider, M.J., Turnipseed, S.B., 2015. Expansion of the scope of AOAC first action method 2012.25 - single-laboratory validation of triphenylmethane dye and leuco metabolite analysis in shrimp, tilapia, catfish, and salmon by LC-MS/MS. J. AOAC Int. 98, 636–648.
Andersen, W.C., Casey, C.R., Nickel, T.J., Young, S.L., Turnipseed, S.B., 2018. Dye residue analysis in raw and processed aquaculture products: matrix extension of AOAC INTERNATIONAL official method 2012.25. J. AOAC Int. 101, 1927–1939.
Anthérieu, S., Chesné, C., Li, R., Camus, S., Lahoz, A., Picazo, L., Turpeinen, M., Tolonen, A., Uusitalo, J., Guguen-Guillouzo, C., Guillouzo, A., 2010. Stable expression, activity, and inducibility of cytochromes P450 in differentiated HepaRG cells. Drug Metab. Dispos. 38, 516–525.
Bumpus, J.A., Brock, B.J., 1988. Biodegradation of crystal violet by the white rot fungus Phanerochaete chrysosporium. Appl. Environ. Microbiol. 54, 1143–1150.
Burka, J.F., Hammell, K.L., Horsberg, T.E., Johnson, G.R., Rainnie, D.J., Speare, D.J., 1997. Drugs in salmonid aquaculture - a review. J. Vet. Pharmacol. Ther. 20, 333–349.
Burkina, V., Zlabek, V., Zamaratskaia, G., 2013. Clotrimazole, but not dexamethasone, is a potent in vitro inhibitor of cytochrome P450 isoforms CYP1A and CYP3A in rainbow trout. Chemosphere 92, 1099–1104.
Burkina, V., Sakalli, S., Pilipenko, N., Zlabek, V., Zamaratskaia, G., 2018. Effect of human pharmaceuticals common to aquatic environments on hepatic CYP1A and CYP3A-like activities in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss): an in vitro study. Chemosphere 205, 380–386.
Cha, C.J., Doerge, D.R., Cerniglia, C.E., 2001. Biotransformation of malachite green by the fungus cunninghamella elegans. Appl. Environ. Microbiol. 67, 4358–4360.
EFSA CONTAM Panel, Knutsen, H.K., Alexander, J., Barregård, L., Bignami, M., Brüschweiler, B., Ceccatelli, S., Cottrill, B., Dinovi, M., Edler, L., Grasl-Kraupp, B., Hogstrand, C., Nebbia, C.S., Oswald, I.P., Petersen, A., Rose, M., Roudot, A.-C., Schwerdtle, T., Vollmer, G., Vleminckx, C., Wallace, H., Filipič, M., Fürst, P., O'Keeffe, M., Penninks, A., Van Leeuwen, R., Baert, K., Hoogenboom, L., 2018. Update: methodological principles and scientific methods to be taken into account when establishing Reference Points for Action (RPAs) for non-allowed pharmacologically active substances present in food of animal origin. EFSA J. 16, e05332.
Connors, K.A., Du, B., Fitzsimmons, P.N., Hoffman, A.D., Chambliss, C.K., Nichols, J.W., Brooks, B.W., 2013. Comparative pharmaceutical metabolism by rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) liver S9 fractions. Environ. Toxicol. Chem. 32, 1810–1818.
Culp, S.J., Blankenship, L.R., Kusewitt, D.F., Doerge, D.R., Mulligan, L.T., Beland, F.A., 1999a. Toxicity and metabolism of malachite green and leucomalachite green during short-term feeding to Fischer 344 rats and B6C3F1 mice. Chem. Biol. Interact. 122, 153–170.
Culp, S.J., Blankenship, L.R., Kusewitt, D.F., Doerge, D.R., Mulligan, L.T., Beland, F.A., 1999b. Toxicity and metabolism of malachite green and leucomalachite green during short-term feeding to Fischer 344 rats and B6C3F$_1$mice. Chem. Biol. Interact. 122, 153–170.
Doerge, D.R., Churchwell, M.I., Gehring, T.A., Pu, Y.M., Plakas, S.M., 1998. Analysis of malachite green and metabolites in fish using liquid chromatography atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom. 12, 1625–1634.
Dubreil, E., Mompelat, S., Kromer, V., Guitton, Y., Danion, M., Morin, T., Hurtaud-Pessel, D., Verdon, E., 2019. Dye residues in aquaculture products: targeted and metabolomics mass spectrometric approaches to track their abuse. Food Chem. 294, 355–367.
Fallah, A.A., Barani, A., 2014. Determination of malachite green residues in farmed rainbow trout in Iran. Food Control 40, 100–105.
Ferron, P.J., Hogeveen, K., De Sousa, G., Rahmani, R., Dubreil, E., Fessard, V., Le Hegarat, L., 2016. Modulation of CYP3A4 activity alters the cytotoxicity of lipophilic phycotoxins in human hepatic HepaRG cells. Toxicol. In Vitro 33, 136–146.
Foster, F.J., Woodbury, L., 1936. The use of malachite green as a fish fungicide and antiseptic. Progressive Fish-Culturist 3, 7–9.
Gräslund, S., Bengtsson, B.E., 2001. Chemicals and biological products used in south-east Asian shrimp farming, and their potential impact on the environment - a review. Sci. Total Environ. 280, 93–131.
Guengerich, F.P., 1992. Cytochrome P450: advances and prospects. FASEB (Fed. Am. Soc. Exp. Biol.) J. 6, 667–668.
Hashimoto, J.C., Paschoal, J.A.R., De Queiroz, J.F., Reyes, F.G.R., 2011. Considerations on the use of malachite green in aquaculture and analytical aspects of determining the residues in fish: a review. J. Aquat. Food Prod. Technol. 20, 273–294.
Holčapek, M., Kolářová, L., Nobilis, M., 2008. High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the identification and determination of phase i and phase II drug metabolites. Anal. Bioanal. Chem. 391, 59–78.
Ikenaka, Y., Oguri, M., Saengtienchai, A., Nakayama, S.M.M., Ijiri, S., Ishizuka, M., 2013. Characterization of phase-II conjugation reaction of polycyclic aromatic hydrocarbons in fish species: unique pyrene metabolism and species specificity observed in fish species. Environ. Toxicol. Pharmacol. 36, 567–578.
James, M.O., Stuchal, L.D., Nyagode, B.A., 2008. Glucuronidation and sulfonation, in vitro, of the major endocrine-active metabolites of methoxychlor in the channel catfish, Ictalurus punctatus, and induction following treatment with 3-methylcholanthrene. Aquat. Toxicol. 86, 227–238.
Jönsson, M.E., Gao, K., Olsson, J.A., Goldstone, J.V., Brandt, I., 2010. Induction patterns of new CYP1 genes in environmentally exposed rainbow trout. Aquat. Toxicol. 98, 311–321.
Lewis, D.F.V., 2004. 57 varieties: the human cytochromes P450. Pharmacogenomics 5, 305–318.
Lněničková, K., Skálová, L., Stuchlíková, L., Szotáková, B., Matoušková, P., 2018. Induction of xenobiotic-metabolizing enzymes in hepatocytes by beta-naphthoflavone: time-dependent changes in activities, protein and mRNA levels. Acta Pharm. 68, 75–85.
Nabb, D.L., Mingoia, R.T., Yang, C.H., Han, X., 2006. Comparison of basal level metabolic enzyme activities of freshly isolated hepatocytes from rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) and rat. Aquat. Toxicol. 80, 52–59.
Negreira, N., Erratico, C., Kosjek, T., van Nuijs, A.L., Heath, E., Neels, H., Covaci, A., 2015. In vitro Phase I and Phase II metabolism of α-pyrrolidinovalerophenone (α-PVP), methylenedioxypyrovalerone (MDPV) and methedrone by human liver microsomes and human liver cytosol. Anal. Bioanal. Chem. 407, 5803–5816.
Negreira, N., Erratico, C., van Nuijs, A.L.N., Covaci, A., 2016. Identification of in vitro metabolites of ethylphenidate by liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry. J. Pharm. Biomed. Anal. 117, 474–484.
Penninks, A., Baert, K., Levorato, S., Binaglia, M., 2017. Dyes in aquaculture and reference points for action. EFSA J. 15, e04920.
Plakas, S.M., El Said, K.R., Stehly, G.R., Gingerich, W.H., Allen, J.L., 1996. Uptake, tissue distribution, and metabolism of malachite green in the channel catfish [Ictalurus punctatus]. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 53, 1427–1433.
RASFF-portal. European commission. https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/.
Ren, W., Li, Y., Zuo, R., Wang, H.J., Si, N., Zhao, H.Y., Han, L.Y., Yang, J., Bian, B.L., 2014. Species-related difference between limonin and obacunone among five liver microsomes and zebrafish using ultra-high-performance liquid chromatography coupled with a LTQ-Orbitrap mass spectrometer. Rapid Commun. Mass Spectrom. 28, 2292–2300.
Reyns, T., Belpaire, C., Geeraerts, C., Van Loco, J., 2014. Multi-dye residue analysis of triarylmethane, xanthene, phenothiazine and phenoxazine dyes in fish tissues by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 953–954, 92–101.
Richter, L.H.J., Flockerzi, V., Maurer, H.H., Meyer, M.R., 2017. Pooled human liver preparations, HepaRG, or HepG2 cell lines for metabolism studies of new psychoactive substances? A study using MDMA, MDBD, butylone, MDPPP, MDPV, MDPB, 5-MAPB, and 5-API as examples. J. Pharm. Biomed. Anal. 143, 32–42.
Sakalli, S., Burkina, V., Pilipenko, N., Zlabek, V., Zamaratskaia, G., 2018. In vitro effects of diosmin, naringenin, quercetin and indole-3-carbinol on fish hepatic CYP1A1 in the presence of clotrimazole and dexamethasone. Chemosphere 192, 105–112.
Schneider, K., Hafner, C., Jäger, I., 2004. Mutagenicity of textile dye products. J. Appl. Toxicol. 24, 83–91.
Schneider, M.J., Andersen, W.C., 2015. Determination of triphenylmethane dyes and their metabolites in salmon, catfish, and shrimp by LC-MS/MS using AOAC first action method 2012.25: collaborative study. J. AOAC Int. 98, 658–670.
Shen, M., Cheng, J., Wu, R., Zhang, S., Mao, L., Gao, S., 2012. Metabolism of polybrominated diphenyl ethers and tetrabromobisphenol A by fish liver subcellular fractions in vitro. Aquat. Toxicol. 114–115, 73–79.
Singh, S., Das, M., Khanna, S.K., 1994. Biodegradation of malachite green and rhodamine B by cecal microflora of rats. Biochem. Biophys. Res. Commun. 200, 1544–1550.
Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal. Biochem. 150, 76–85.

Smith, E.M., Iftikar, F.I., Higgins, S., Irshad, A., Jandoc, R., Lee, M., Wilson, J.Y., 2012. In vitro inhibition of cytochrome P450-mediated reactions by gemfibrozil, erythromycin, ciprofloxacin and fluoxetine in fish liver microsomes. Aquat. Toxicol. 109, 259–266.

Srivastava, S., Sinha, R., Roy, D., 2004. Toxicological effects of malachite green. Aquat. Toxicol. 66, 319–329.

Tao, Y., Chen, D., Chao, X., Yu, H., Yuanhu, P., Liu, Z., Huang, L., Wang, Y., Yuan, Z., 2011. Simultaneous determination of malachite green, gentian violet and their leuco-metabolites in shrimp and salmon by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with accelerated solvent extraction and auto solid-phase clean-up. Food Control 22, 1246–1252.

Tarbin, J.A., Chan, D., Stubbings, G., Sharman, M., 2008. Multiresidue determination of triarylmethane and phenothiazine dyes in fish tissues by LC-MS/MS. Anal. Chim. Acta 625, 188–194.

Thompson Jr., H.C., Rushing, L.G., Gehring, T., Lochmann, R., 1999. Persistence of gentian violet and leucogentian violet in channel catfish (ictalurus punctatus) muscle after water-borne exposure. J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl. 723, 287–291.

Turnipseed, S.B., Andersen, W.C., Roybal, J.E., 2005. Determination and confirmation of malachite green and leucomalachite green residues in salmon using liquid chromatography/mass spectrometry with no-discharge atmospheric pressure chemical ionization. J. AOAC Int. 88, 1312–1317.

Vestergren, A.S., Zlabek, V., Pickova, J., Zamaratskaia, G., 2012. Tolbutamide hydroxylation by hepatic microsomes from Atlantic salmon (Salmo salar L.). Mol. Biol. Rep. 39, 6867–6873.

Villar-Pulido, M., Gilbert-Lopez, B., Garcia-Reyes, J.F., Martos, N.R., Molina-Diaz, A., 2011. Multiclass detection and quantitation of antibiotics and veterinary drugs in shrimps by fast liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. Talanta 85, 1419–1427.

WHO/FAO, 2015. Maximum Residue Limits (MRLs) and Risk Management Recommendations (RMRs) for Residues of Veterinary Drugs in Foods. CAC/MRL 2-2015-Updated as at the 38th Session of the Codex Alimentarius Commission (July 2015).

Zhang, Y., Sun, Y., Mu, X., Yuan, L., Wang, Q., Zhang, L., 2017. Identification of metabolites of vindoline in rats using ultra-high performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 1060, 126–137.

Zlabek, V., Burkina, V., Borrisser-Pairó, F., Sakalli, S., Zamaratskaia, G., 2016. Phase I metabolism of 3-methylindole, an environmental pollutant, by hepatic microsomes from carp (Cyprinus carpio) and rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Chemosphere 150, 304–310.

Article 3 : Tissue distribution, metabolism, and elimination of the dye Victoria pure blue lead to an appropriate biomarker in trout

1.1 Contexte

Une précédente étude de métabolomique *in vivo* chez la truite arc-en-ciel traitée (article 1) a conduit à la découverte de certains marqueurs d'acide biliaire endogènes ainsi que de deux métabolites du VPBO, le DLVPBO et le tri-dééthyl-VPBO (Dubreil et al., 2019b, 2020a). L'étude *in vitro*, quant-à-elle, a mis en évidence l'apparition de nombreux métabolites, dont un majeur, le dééthyl-VPBO (article 2). Nous avons mis en place une étude de pharmacocinétique avec une déplétion sur deux mois chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhinchus mykiss*), afin de définir plus précisément un résidu marqueur. L'expérimentation a été conduite à l'Anses de Plouzané dans l'Unité Pathologies Virales des Poissons, comme pour l'étude de métabolomique.

Les objectifs étaient (1) d'identifier le principal métabolite du VPBO dans la truite arc-en-ciel traitée; (2) de caractériser la distribution tissulaire de VPBO et de son principal métabolite trouvé dans la truite arc-en-ciel traitée pendant les périodes d'absorption et de dépuration; (3) d'estimer et de comparer les temps de demi-vie du VPBO et de son principal métabolite dans les muscles et la peau; et (4) de suggérer un résidu marqueur dans les tissus comestibles (muscle + peau) pour des évaluations appropriées en sécurité sanitaire des aliments.

1.2 Méthodologie et principaux résultats

Méthodologie de la phase animale :

Traitement et dépuration : Le colorant a été administré à la truite arc-en-ciel pendant une journée au bain-marie en circuit fermé à une dose de 0,1 mg.L^{-1}. Le système a été ensuite positionné en circuit ouvert pendant environ deux mois pour l'étude de la dépuration du VPBO.

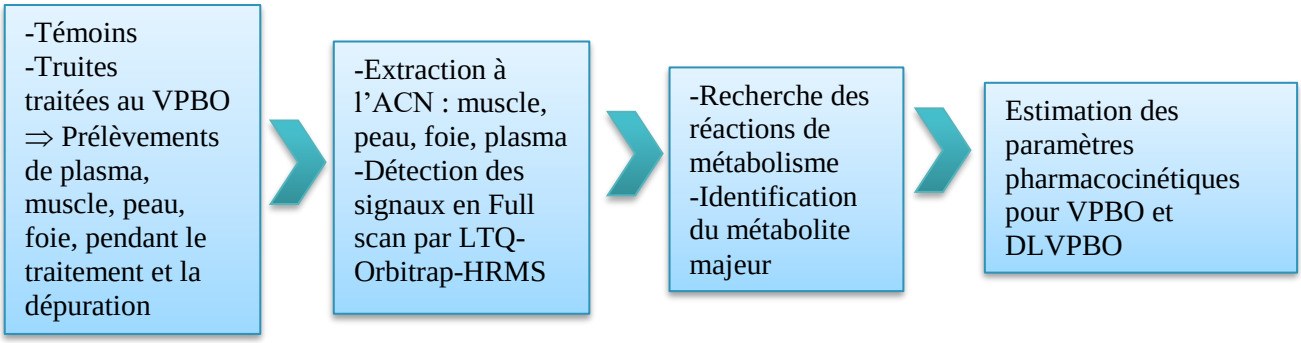
Pendant ces périodes, 6 poissons étaient prélevés:

- Durant le traitement à: 0.083, 0.25, 0.417 et 1 jour.

- Durant la dépuration à: 2, 3, 5, 9, 17, 34, 49 et 65 jours.

Méthodologie de recherche d'un résidu marqueur :

Le principe de cette approche était d'analyser les signaux obtenus après extraction des tissus de poisson et analyse LC-HRMS, afin de les exploiter par des modèles de pharmacocinétique pour le VPBO et un métabolite majeur identifié. Le VPBO a été dosé par une méthode validée puis la concentration du métabolite majeur identifié, le DLVPBO, a été estimée en considérant une équivalence de signal avec le parent. L'exploitation pharmacocinétique a été réalisée pour les tissus cibles de muscle et de peau. Un modèle non-compartimental a été appliqué pour déterminer les paramètres de pharmacocinétique.



Principaux résultats :

Objectifs : identifier le métabolite majeur, appréhender la pharmacocinétique du VPBO chez la truite arc-en-ciel. Proposer un résidu marqueur de traitement.

Phase animale, prélèvements et extraction des tissus

Recherche des métabolites formés

-Méthode validée pour le dosage du VPBO dans le muscle, la peau, le foie, le plasma.
-Détection de 15 métabolites, dont 14 métabolites de phase I proposés et 1 de phase II
-Le DLVPBO identifié comme métabolite majeur dans le muscle et la peau de truite.

Dosage du VPBO dans les tissus
Pharmacocinétique du VPBO et DLVPBO

-VPBO :
Traitement :
Foie>peau>muscle>plasma
Dépuration :
Conc. VPBO > LOQ dans muscle et peau
Demi-vie élimination= 17.1 jours muscle
Temps de résidence moyen : 12.7 jours peau et 20.7 jours muscle

-DLVPBO :
Dépuration :
Cmax DLVPBO < Cmax VPBO muscle et peau
Demi-vie élimination= 22.5 jours muscle
Temps de résidence moyen : 29.9 jours peau et 43.1 jours muscle

1.3 Conclusion

A notre connaissance, aucune étude pharmacocinétique n'a jamais été réalisée sur le composé VPBO chez les poissons. Nous avons pu montrer que le VPBO est rapidement absorbé et distribué dans le muscle, la peau, et le foie après une administration dans l'eau du bassin pendant un jour. Nous avons identifié l'apparition de 15 métabolites, dont 14 de phase I et un de phase II proposé. Ces métabolites, excepté celui de phase II, sont similaires à ceux détectés *in vitro*. Le dééthyl-leuco-VPBO, identifié auparavant pendant l'étude de métabolomique, a été déterminé comme le plus intense et le plus persistant sur la période de dépuration de 2 mois dans les tissus. Bien que les concentrations du VPBO soient supérieures à celles du DLVPBO au début du traitement, elles tombent en-dessous celle du DLVPBO au bout de 17 jours de dépuration dans le muscle et la peau. Nous avons pu démontré qu'au bout de 60 jours de traitement, les concentrations de VPBO et son métabolite majeur, le DLVPBO, sont encore détectables dans le muscle et la peau. Le DLVPBO semble légèrement (environ 3 fois) plus intense que son parent à la fin de cette période. Ces résultats démontrent que le VPBO et son métabolite majeur, le DLVPBO, devraient être suivis dans les tissus comestibles de poisson. Le DLVPBO est un résidu marqueur approprié car il est plus persistant, et le VPBO est plus intense dans la première partie du traitement. C'est pourquoi la surveillance de ces deux résidus ne doit pas être dissociée pour un contrôle efficace des résidus.

Chemosphere 262 (2021) 127636

Contents lists available at ScienceDirect

Chemosphere

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chemosphere

Tissue distribution, metabolism, and elimination of Victoria Pure Blue BO in rainbow trout: Main metabolite as an appropriate residue marker

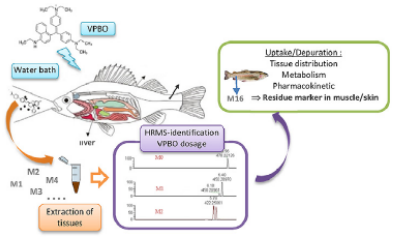
Estelle Dubreil [a, *], Michel Laurentie [a], Jean-Michel Delmas [a], Morgane Danion [b], Thierry Morin [b], Dominique Hurtaud-Pessel [a], Alexis Viel [a], Pascal Sanders [a], Eric Verdon [a]

[a] Laboratory of Fougères, French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety, ANSES, Fougères, France
[b] Laboratory of Ploufragan-Plouzané-Niort, French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety, ANSES, Ploufragan-Plouzané-Niort, France

HIGHLIGHTS

- The metabolism of Victoria Pure Blue BO (VPBO) was investigated in rainbow trout.
- Residues were detected by LC-HRMS in muscle, plasma, skin, and liver.
- The half-lives of VPBO and the main metabolite were assessed.
- Deethyl-leuco-VPBO is proposed as a marker of exposure to VPBO in rainbow trout.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:
Received 29 April 2020
Received in revised form
3 July 2020
Accepted 5 July 2020
Available online 17 July 2020

Handling Editor: David Volz

Keywords:
Mass spectrometry
Fish metabolism
Dyes
Treatment
Depuration
Kinetics

ABSTRACT

Victoria Pure Blue BO is a dye that bears some therapeutic activity and that can be retrieved in effluent or may be used in aquaculture as a prohibited drug. In this study, the metabolism and tissue distribution during uptake and depuration of VPBO were investigated in order to propose a residue marker of illegal treatment in fish. The dye was administered to rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*) for one day by water bath at a dose of 0.1 mg.L^{-1}. The concentrations of VPBO in all tissues increased rapidly during the treatment period, reaching a C_{max} of 567 ± 301 µg.L^{-1} in plasma and 1846 µg kg^{-1} ±517 for liver after 2 h. After placing the rainbow trout in a clean water bath for a 64 day-period of depuration, the concentrations in the tissues and plasma decreased to reach comparable levels for muscle and for skin after 33 days. The concentrations measured were still above the LOQ at 2.26 ± 0.48 µg kg^{-1} for muscle and 2.85 ± 1.99 µg kg^{-1} for skin at the end of the depuration period. The results indicated the existence of 14 phase I metabolites and one glucuronide conjugated metabolite. Non-compartmental analysis was applied to assess the pharmacokinetic parameters. The half-life in edible muscle of the main metabolite detected, deethyl-leuco-VPBO, was found to be 22.5 days compared to a half-life of 19.7 days for the parent VPBO. This study provides new information to predict a VPBO drug treatment of aquacultured species via a proposed new residue marker.

© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

* Corresponding author.
E-mail address: estelle.dubreil@anses.fr (E. Dubreil).

https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127636
0045-6535/© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Victoria Pure Blue BO (VPBO), also known as Basic blue 7, is a dye that was found in contaminated panga fish (*pangasius bocourti*) imported from Vietnam in 2010. The contamination was reported in Europe via the Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) managed by the European Union (notification 2010.1372) (RASFF-portal, European Commission). The contamination could have originated from environmental effluent waste because Basic blue 7 is commonly used in the industry to dye certain textiles (Gessner and Mayer, 2000). Alternatively, it could have come from intentional and illegal treatment in aquaculture. The efficacy of the substance has not been proven in aquaculture, but it has been demonstrated in the past that it could bear some therapeutic activity. A research team (Alderman, 1982) developed *in vitro* tests to determine the efficacy of 11 therapeutic triarylmethane dyes, including VPBO, against the parasitic fungi *Saprolegnia parasitica* in fish. In a recent report issued by the European Food Safety Authority (EFSA), VPBO was classified as potentially genotoxic, along with 19 other dyes, due to a lack of knowledge regarding its genotoxicity (ECHA; EFSA et al., 2017). VPBO has been found to efficiently bind to DNA and to mediate its photochemical destruction in tumor cells (Lewis and Indig, 2001, 2002). Based on this isolated information and modeling using a quantitative structure-activity relationship (QSAR) approach, EFSA concluded that VPBO should be considered genotoxic (EFSA et al., 2017). The dye was assigned to group I on the basis of a decision tree applying a toxicological screening value (TSV) of 0.0025 μg kg $^{-1}$ body weight per day (EFSA et al., 2017). This TSV could serve as a basis in the near future if EFSA sets a Reference Point for Action (RPA), an action limit related to illegal veterinary drugs found in animal food products. The suspicion of toxicity was recently underpinned by a study within the framework of the Tox21 national program in the United States. The toxicity of 10,000 chemicals has been studied in 70 different cell tests covering more than 200 cells signaling pathways. While MG is ranked among the 30 most active drugs, VPBO (basic blue 7) is the most active compound among environmental contaminants (Ngan et al., 2019). In addition, the structure of VPBO, a cationic dye derived from the family of triarylmethanes by the replacement of an aryl group and methyl groups by a naphthyl group and ethyl groups, respectively, may result in certain physicochemical properties associated to the well-known compounds Malachite Green (MG) and Crystal Violet (CV). Probably the most widely used of these chemicals is MG, which is the most popular fungicide in farmed and pet fish and is also effective against ectoparasites in certain protozoan parasite conditions (Alderman, 1985; Srivastava et al., 2004). Since MG and its major metabolite Leuco-Malachite Green (LMG) have several toxic effects in mammalian cells, MG has never been registered as a veterinary medicinal product in the European Union; this is also the case for Crystal Violet. The United States Food and Drug Administration has also not approved any use of these dyes (Culp et al., 1999; Srivastava et al., 2004; Verdon et al., 2015). Despite their toxicity in humans and fish, MG and CV are still used worldwide, probably because no other pharmaceutical drugs have proven to be as effective, and too few therapeutic treatments are currently approved in fish farming (Schnick, 1988; Sudova et al., 2007; Okocha et al., 2018). It has been found that illegal drugs are sometimes replaced by similar illegal drugs or cocktails of these substances (Dervilly-Pinel et al., 2015; Gallart-Ayala et al., 2015).

Although LMG is the main residue marker of MG illegal treatment in aquaculture practices, no residue marker has ever been defined for the Victoria dye family and in particular, for VPBO. A previous *in vitro* study in rainbow trout involving incubation of subcellular fractions with dyes suggested that the main metabolite would be deethyl-VPBO (Dubreil et al., 2020b). A previous *in vivo* metabolomics study in treated rainbow trout led to the discovery of certain endogenous bile acid markers and also two VPBO metabolites (Dubreil et al., 2019b, 2020a). To the best of our knowledge, no pharmacokinetic study has ever been carried out on the VPBO compound in fish. However, a few studies described the pharmacokinetics of MG and LMG. MG is rapidly absorbed in different fish species, partly depending on the pH and water temperature in ponds, and it is reduced to its leucoform (LMG) that remains in tissues for long periods (Alderman and Clifton-Hadley, 1993; Máchová et al., 1996; Plakas et al., 1996; Bergwerff et al., 2004; Jiang et al., 2009; Bajc et al., 2011; Kwan et al., 2020).

In order to provide information for food control, the present study was performed in rainbow trout to determine the appropriate residue marker after waterborne exposure to VPBO. The objectives were (1) to identify the main metabolite of VPBO in treated rainbow trout; (2) to characterize the tissue distribution of VPBO and its main metabolite found in treated rainbow trout during the uptake and depuration periods; (3) to estimate and compare the half-lives of VPBO and its major metabolite in muscle and skin; and (4) to suggest a residue marker in edible tissue (muscle + skin) for appropriate food safety assessments.

2. Materials and methods

2.1. Reagents and analytical standards

The standard substances Victoria Pure Blue BO (VPBO), and internal standard (IS) Malachite Green-d_5 (MG-d_5), were purchased from Sigma-Aldrich (Europe). The IS Crystal Violet-d_6 (CV-d_6) was obtained from WITEGA (Berlin, Germany). MG-d_5 was used to correct the peak area of MG and CV-d_6 for VPBO. For the analytical assay, a stock solution of VPBO was prepared at 100 μg mL $^{-1}$ in methanol (not dedicated to the animal study). Stock solutions were further diluted to obtain several concentrations ranging from 0.01 μg mL $^{-1}$ to 1 μg mL $^{-1}$. The internal standards were prepared at 0.1 mg mL $^{-1}$ in acetonitrile. For the rainbow trout experiment, a stock solution of VPBO was prepared at 1000 μg mL $^{-1}$ in water.

Acetonitrile, methanol, ammonium acetate, and formic acid were of the appropriate analytical grade (HPLC grade). Water was purified using a Milli-Q system (Millipore, Taunton, MA, USA).

2.2. Experimental study design

This study was conducted in order to evaluate the uptake and depuration kinetics of the parent compound and its major metabolites.

A total of 100 specific pathogen-free rainbow trout including a mixture of males and females from the same genetic group were used in this experiment. They were handled at the protected and monitoring facilities of the ANSES Plouzané laboratory site (France). The fishes in the study batch were one year old, with a weight of 105 ± 25 g and length of 15 ± 2 cm. They were fed with commercial dry pellets at 1.5% body weight (Neo Prima 4, Le Gouessant Aquaculture, France) once a day.

The experimental tank of 400 L was maintained in an open circuit with purified fresh river water at a flow rate of 0.3 m^3 h^{-1} (temperature 13 ± 1 °C, dissolved oxygen < 90%, pH close to 8, and free of nitrates and nitrites) throughout the experiment. The tank was maintained in a natural light/dark cycle (14 h/10 h in spring, approximately) in a room with an air volume change every hour.

After one week in acclimation, 20 control fishes free of exposure were collected and euthanized to obtain blank matrices. The system was then positioned in a closed-circuit configuration where the tank was exposed to 0.1 mg.L $^{-1}$ of VPBO by adding 40 mL of a standard solution dissolved in water at 1 g.L $^{-1}$ into the tank (dose of

40 mg.kg ^{1} b. w. Of VPBO). After a 24-h accumulation period, the fishes were transferred to a new tank, for a 64-day depuration period in a purified fresh river water open circuit.

Six fishes were randomly sampled at several sampling dates:

- during the 24-h exposure period at: 0.083, 0.25, 0.417 and 1 day.
- post treatment during the depuration period at 2, 3, 5, 9, 17, 34, 49 and 65 days.

For each fish, 1 mL of blood was withdrawn from the caudal vein by means of a lithium heparinized vacutainer (BD Vacutainer LH 85 IU). Whole blood samples were centrifuged (1200×g, 10 min, 4 °C) and plasma was stored at −80 °C. Fishes were euthanized after collecting blood by percussive stunning with a head blow, and were then measured and weighed. Liver and muscles with skin were removed and stored at −80 °C for future analysis. Skin was separated from muscle before freezing. The European Medicines Agency (EMA) has indicated that the target tissue considered appropriate for Salmonidae is muscle including the skin, in natural proportions, as the edible tissue in fish. However, for the purposes of food safety assessments for prohibited drugs, it was decided to separate muscle and skin to have a clear picture of contamination in individual tissues (CVMP, 1998).

This study was approved by the French Ethics Committee No.16, reference number 12222−201,711,161,618,463.

2.3. Sample preparation for the study of VPBO in muscle, plasma, skin, and liver

Samples were weighed (2 g of mixed muscle, 200 µL of plasma, 200 mg of mixed skin, 200 mg of mixed liver) and transferred to a centrifuge tube. Then 100 µL for muscle or 10 µL for plasma, skin, and liver of the internal standard solutions (MG-d_5 and CV-d_6 at 50 µg.L ^{1} in acetonitrile) were added. The sample was vortex-mixed and left to stand for 10 min in the dark. Then, acetonitrile was added: 8 mL for muscle, 1 mL for plasma, skin, and liver). The sample was vortex-mixed to homogenize the material with the solvent. The sample was further placed on a mechanical rotary shaker for 15 min at 100 rpm, and then placed in an ultrasound bath for 5 min at 20 °C ± 2 °C. Samples were centrifuged for 10 min at 20,000×g refrigerated at 4 °C. The supernatant was transferred to a polypropylene tube and evaporated to dryness under gentle nitrogen flow at 50 °C. The dry extracts was dissolved by ultrasound in acetonitrile/water for reconstitution (80/20, v/v) (500 µL for muscle, 200 µL for plasma, skin, and liver), and vortex-mixed. The residue for muscle was extracted through a 0.45 µm syringe PVDF filter, and the residues for the other matrices were extracted by centrifugation for 5 min at 20,000×g refrigerated at +4 °C. The samples were transferred to LC vials.

2.4. Liquid chromatography-high resolution mass spectrometry analysis

The investigation of metabolism was conducted in two steps: first the concentration of the parent compound was measured via a quantitative LC-HRMS method, and then the formation of metabolites was studied via the metabolite research software MetWorks®. Chromatography was performed on a Thermofisher U-HPLC Accela system (Bremen, Germany), fitted with a Phenomenex Luna C18 (2) column (Phenomenex, Torrance, CA, USA) (150 × 2.0 mm, 3 µm). The final reconstitution solution for samples after extraction was prepared by mixing 80% acetonitrile with 20% water. Chromatographic separation was carried out using two mobile phase preparations, consisting of mobile phase (A), a mixture of ammonium acetate 10 mM.L ^{1} and 0.1% formic acid, and mobile phase (B), 100% acetonitrile. The gradient conditions were as follows: from 0 to 4 min, ramp up linearly from 98 to 2% of mobile phase A and hold for 4 min, then ramp back over 0.1 min to initial conditions and hold for 4 min to re-equilibrate the system. The flow rate was set at 0.2 mL min ^{1}, the injection volume was 10 µL, and the column oven was maintained at 25 °C. The LTQ Orbitrap XL mass spectrometer (Thermofisher, Bremen, Germany) was operated with an electrospray ionization probe in positive mode, using the following source parameters: sheath gas flow rate: 30 arb; auxiliary gas flow rate: 10 arb; sweep gas flow rate: 2 arb; ion spray voltage: 5 kV; capillary temperature: 275 °C; capillary voltage: 35 V; and tube lens: 90 V. The instrument was calibrated using the manufacturer's calibration solution, to reach mass accuracies in the 1−3 ppm range. The instrument was operated in full-scan mode from m/z 100−1,000, at a resolving power of 60,000 (full width at half maximum), allowing VPBO detection as $VPBO^{+}$ ions, as well as metabolite formation investigations using the metabolism software MetWorks 1.3.0. SP1 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Exact masses of the peaks detected by this software were extracted with a mass window of 5 ppm around the ionized precursor ion, to confirm or discard their identity. For confirmation of the identity of the major metabolite (deethyl-leuco-VPBO), MS^2 mass fragmentation of the compound was performed in the LTQ-Orbitrap mass analyser. The energy for collision-induced dissociation (CID) were set at 35 eV and 70 eV, with an isolation width of m/z 1.

2.5. Validation of the analytical method for VPBO

Calibration curves were prepared by spiking muscle, plasma, skin, and liver prior extraction with VPBO, with the following concentrations: 0.5, 1, 5, 10, and 50 µg kg ^{1}. These calibration samples were prepared and analyzed in duplicate on three different days for muscle, and 1 day each for plasma, skin, and liver to combine the three series. This protocol was chosen in order to select the most appropriate response function. The validation standards were reconstituted samples with matrix containing known concentrations of the analyte of interest. These were prepared at three levels of concentration corresponding to low (estimated limit of quantification), intermediate, and high concentrations levels: 0.5, 5 and 50 µg kg ^{1} of VPBO. These validation samples were prepared and analyzed in triplicate on three consecutive days for muscle, and 1 day each for plasma, skin, and liver to combine the three series of the three days.

The statistical analysis of validation data was based on the accuracy profile using e. noval® software, Version 4.1 b (Pharmalex, Liège, Belgium). The concentrations of the validation samples were calculated from the experimental result to determine mean relative bias, repeatability, intermediate precision, and β-expectation tolerance interval limits with a 90% level. The acceptance limit was set at ± 50%.

2.6. Pharmacokinetic analysis

For the dosing during treatment and depuration periods, concentrations under the lower limit of quantification (LOQ) were discarded. Samples above the upper LOQ were diluted to enter into the validated range. Matrix-matched calibration curves were performed for the dosing of VPBO in several batches. The equation of the curves from VPBO dosing were used to assess the concentration of DLVPBO, assuming the mass spectrometric response would be equivalent, because no specific analytical standard is commercially available for this metabolite.

A non-compartmental model was used to determine the pharmacokinetic parameters. All pharmacokinetic analyses were

performed with Phoenix WinNonlin 8.2 software (Certara, Saint Louis, MO, USA).

2.6.1. Non-compartmental analysis

The observed data were sparse; one point per animal and six animals per time point were used. In this type of design, it was not possible to distinguish inter-individual from intra-individual variability, and consequently the present analysis focused on mean parameters and not on inter-individual variability. Therefore, it was only possible to calculate the standard error of the mean (SEM) for two parameters C_{max} and AUC_{last}.

The maximum concentration (C_{max}) and the time to reach it (T_{max}) were estimated from each tissue concentration versus the time profile.

For plasma or tissues, the total area under the time curve (AUC_{inf}) was determined using the linear trapezoidal rule with extrapolation to infinity. Extrapolation $AUC_{(Clast\ inf)}$ was based on the following equation:

$$AUC_{(Clast-inf)} = \frac{C_{last}}{\lambda_z}$$

where C_{last} is the last observed concentration and λ_z the slope of the terminal phase.

Consequently, the AUC_{inf} was calculated by:

$$AUC_{inf} = AUC_{(0-Clast)} + AUC_{(Clast-inf)}$$

where $AUC_{(0\ Clast)}$ is the AUC between 0 and C_{last}.

The terminal slope was estimated from the linear part of the terminal phase by at least three points, and was conserved if the coefficient of determination r^2 was >0.95.

The half-life of compounds ($t_{1/2}\ \lambda_z$) was determined using λ_z by the following formula:

$$t_{1/2\ \lambda_z} = \frac{0.693}{\lambda_z}$$

Partial areas were also estimated by linear trapezoidal method between [0-1d], [1-5d], [5-17d], and [17d-65d] i.e. the treatment period, the first depuration period, the second period and the last period after the treatment respectively.

The mean residence time (MRT) was calculated using the linear trapezoidal rule between 0 and C_{last} or with extrapolation to infinity. Apparent total body clearance ($Cl_{tot/F}$) and apparent volume of distribution at steady state (Vss/F) were also determined by:

$$CL_{tot/F} = \frac{Dose}{AUC_{inf}}$$

and. $Vss/_F = MRT\ x\ CL_{ss}$

For both the parent compound and its major metabolite, the time to reach the concentration at the LOQ was not measured. However, it was estimated by extrapolation using a simple exponential equation defined by the elimination rate and the apparent volume of distribution.

$$C = A \times e^{-\lambda_z \times t}$$

Where C is the tissue concentration, λ_z is the elimination rate and A is the fitted apparent constant.

2.6.2. Statistical analysis

Pharmacokinetic parameters (AUC_{last}, C_{max}) are expressed as arithmetic means, with associated standard error of the mean. The NCA sparse methodology calculates pharmacokinetics parameters based on the mean profile for all the individuals in the dataset. The NCA object calculates the standard error for the mean concentration curve's maximum value (Cmax), and for the area under the mean concentration curve from dose time through the final observed time. These parameters obtained in muscle and skin for VBPO and DLVBPO were compared by a *t*-test. A level a significance of 5% was retained.

3. Results

3.1. Analytical method performance for VPBO analysis

Linear regression with 1/X weighting was selected as the regression model for the validation in muscle on three different days, yielding the best response function and the best accuracy profile among those tested. Quadratic regression with 1/X weighting was selected as the regression model for global validation in plasma, skin, and liver matrices. The global validation was performed on three days, with one day of validation for each matrix (Hubert et al., 2004, 2007a, 2007b). The corresponding results are presented in Supplementary Table S1.

Trueness was lower than 10% in recovery on the validation range from 0.5 to 50 μg kg ^{1} (or μg.L ^{1} for plasma), except at 0.5 μg kg ^{1} (or μg.L ^{1} for plasma) for the three combined matrices for which recovery was 112.3%. This value obtained for three matrices that were entirely different and at low concentrations, was however, considered satisfactory. For precision (repeatability and intermediate precision), relative standard deviations (RSDs) did not exceed 10% for muscle from 0.5 to 50 μg kg ^{1}. At 0.5 μg kg ^{1} (or μg.L ^{1}: plasma), RSDs did not exceed 15% for the combined plasma-skin-liver matrices.

The β-expectation tolerance interval limits (%) were within the acceptance limits (±50%) for both muscle and combined plasma-skin-liver matrices. This method is thus accurate from 0.5 to 50 μg kg ^{1} (or μg.L ^{1} for plasma) for all matrices.

The limit of detection (LOD) was estimated at 0.15 μg kg ^{1} (or μg.L ^{1} for plasma) for all matrices. The estimated lower and upper LOQs were 0.5 and 50 μg kg ^{1} (or μg.L ^{1} for plasma). For muscle, the risk of error was below 0.1%. For the combined plasma-skin-liver matrices from 0.5 to 50 μg kg ^{1} (or μg.L ^{1} for plasma), this risk was below 2%.

For muscle, the relative uncertainty was limited to 20%, and for the combined plasma-skin-liver matrices, it was limited to 17%, except at 0.5 μg kg ^{1} (L ^{1} for plasma) (31%) (Supplementary Table S2).

The equations for the linearity of the results are provided in Supplementary Table S3. The coefficients of determination R^2 were above 0.99. The β-expectation tolerance interval limits were within the acceptance limits (±50%) for all matrices, regardless of the concentration of the validation standards, as shown in Supplementary Figure S1.

3.2. Metabolites of VPBO

Metabolites were detected from the total ion current of chromatograms in muscle, plasma, skin, and liver by MetWorks software, and metabolites were then tentatively identified based on their accurate masses, mass errors, and retention times compared to VPBO retention times. As shown in Table 1, there were 15 metabolites of VPBO in total found in rainbow trout. The exact and measured masses matched with a mass error below 5 ppm, providing support for the proposed elemental compositions of metabolites. During the treatment period, the total amount of metabolites followed the order: liver > muscle ≅ plasma > skin. Otherwise, during the depuration period, the total amount of

Table 1
In vivo LC-Orbitrap-HRMS data for VPBO and its metabolites in rainbow trout. Metabolites M7, M9, M12, and M13 were not detected contrary to our previous *in vitro* study (ND: non detected).

Compound ID	Reaction proposed	Δm/z	Molecular formula	Calculated mass	Measured mass	Error (ppm)	RT (min)
M0 (VPBO)	/	/	$C_{33}H_{40}N_2$	478,3216	478,3205	2,3	7,1
M1	N-deethylation	−28,0313	$C_{31}H_{36}N_2$	450,2903	450,2895	1,77	6,5
M2	double N-deethylation	−56,0626	$C_{29}H_{32}N_2$	422,259	422,2583	1,65	6,0
M3	triple N-deethylation	−84,0939	$C_{27}H_{28}N_2$	394,2277	394,227	1,77	5,4
M4	quadruple N-deethylation	−112,1252	$C_{25}H_{24}N_2$	366,1964	366,1958	1,64	5,0
M5	quintuple N-deethylation	−140,1565	$C_{23}H_{20}N_2$	338,1651	338,1646	1,48	4,7
M6	N-demethylation	−14,0157	$C_{32}H_{38}N_2$	464,3059	464,305	1,94	6,8
M7	N-deethylation + N-demethylation	−42.0470	$C_{30}H_{34}N_2$	436.2746	ND	ND	ND
M8	N-oxidation	15,9949	$C_{33}H_{40}N_2O$	494,3165	494,3158	1,41	6,0
M9	N-deethylation + N-oxidation	−12.0364	$C_{31}H_{36}N_2O$	466.2852	ND	ND	ND
M10	N-oxidation + double N-deethylation	−40,0677	$C_{29}H_{32}N_2O$	438,2539	438,2538	0,23	5,5
M11	N-oxidation + triple N-deethylation	−68,0990	$C_{27}H_{28}N_2O$	410,2226	410,2221	1,21	5,2
M12	N-oxidation + deshydrogenation	13.9792	$C_{33}H_{38}N_2O$	492.3008	ND	ND	ND
M13	N-deethylation + N-oxidation + deshydrogenation	−14.0521	$C_{31}H_{34}N_2O$	464.2695	ND	ND	ND
M14	N-oxidation + deshydrogenation + double N-deethylation	−42,0833	$C_{29}H_{30}N_2O$	436,2382	436,2377	0,06	5,1
M15	N-oxidation + deshydrogenation + triple N-deethylation	−70,1146	$C_{27}H_{26}N_2O$	408,2069	408,2063	1,47	4,8
M16	double-bound reduction + N-deethylation	−26,0157	$C_{31}H_{38}N_2$	452,3060	452,3053	1,54	10,1
M17	double-bound reduction	2,0156	$C_{33}H_{42}N_2$	480,3373	480,3371	0,42	9,3
M18	double-bound reduction + double N-deethylation	−54,0470	$C_{29}H_{34}N_2$	424,2747	424,2739	1,89	8,5
M19	glucuronidation + N-oxidation	192,0270	$C_{39}H_{48}N_2O_7$	670,3486	670,3476	1,49	5,3

metabolites followed this order: muscle > skin ≈ liver > plasma. The intensities of signals for metabolites are shown in Supplementary Figure S2. The metabolites found in this animal experiment were quite similar to those found in a previous *in vitro* study (Dubreil et al., 2020b). However, we observed a few differences that are described below.

3.3. Phase I metabolites

The $[M]^+$ ions of metabolites M1 to M6 matched with dealkylation reactions regarding loss of masses of VPBO. The same dealkylated metabolites were observed as those in the *in vitro* study except that the deethylation + demethylation could not be observed *in vivo*. VPBO underwent successive deethylation for M1 to M5 (removal of 28.03130 Da) and demethylation for M6 (removal of 14.01565 Da). M1 (*m/z* 450.2903) to M5 (*m/z* 338.1651) had retention times of 6.5, 6.0, 5.4, 5.0, and 4.7 min, respectively. Retention times decreased with the number of deethylations, so the shortest retention time was assigned to quintuple N-deethylation (M5), consolidating the proposed pathway of successive deethylations. Metabolite M6 had a retention time of 6.8 and showed $[M]^+$ ion at *m/z* 464.3059.

Metabolites M8, M10, M11, M14, and M15 followed N-oxidation and also dehydrogenation for M14 and M15, as cited in the previous *in vitro* study (Dubreil et al., 2020b). However, metabolites M7 (deethylation + demethylation), M9 (deethylation + oxidation), M12 (oxidation + dehydrogenation), and M13 (deethylation + oxidation + dehydrogenation) detected in the *in vitro* study were not observed *in vivo*. M8, M10, M11, M14, and M15 eluted at 6.0, 5.5, 5.2, 5.1, and 4.8 min, respectively. Certain ions were observed at 16 Da higher compared to the non-oxidized ion, for example M9 (deethylation + oxidation) compared to M1 (deethylation).

The double-bound reduction reaction was observed more strongly in treated rainbow trout than after *in vitro* incubations for which the major metabolite identified was the deethyl-VPBO (M1) without the double-bound reduction. Three proposed reactions were observed, (1) the double-bound reduction reaction which is also very well described for triarylmethane dyes, (2) the double-bound reduction + deethylation reaction, and (3) the double-bound reduction + double deethylation reaction. Only metabolite M16 corresponding to reaction (3) was observed weakly during the previous *in vitro* incubation. Metabolite M17 could be proposed as the leuco form of VPBO at *m/z* 480.3371 and eluted at 9.3 min. It was at least 10 times less intense than M16 in muscle and skin (Table 2). M18 was observed between 1.1 and 3.3 times more intense than M17 in muscle and skin, corresponding to double-bound reduction + deethylation at *m/z* 424.2747 and retention time at 8.5 min. M16 was observed at least 10 times more intense in muscle and skin compared to M17 and M18, which could explain why it was the only ion detected *in vitro* that undergoes double-bound reduction. M16 was detected at *m/z* 452.3053 and retention time at 10.1 min. The chromatograms of M16 and the parent VPBO are shown in Fig. 1.

This *in vivo* metabolism study identified the most intense metabolite as M16 during the depuration period, as shown in the mean peak areas of metabolites in Supplementary Figure S2. This deethyl-leuco metabolite was found in the four matrices, and was also present in large amounts during the depuration period. Its identity was confirmed by the CID fragment ions (*m/z* = 423.18, 379.39, 303.38, 252.37) and compared to the fragmentation of the deethyl-VPBO carried out during a previous *in vitro* study. However, only one isomer could be retrieved *in vivo* compared to *in vitro* where two isomers where detected (Dubreil et al., 2020b). As a result, the deethyl-leuco VPBO (DLVPBO) was integrated in further data analysis to compare its pharmacokinetic parameters with those of VPBO.

3.4. Phase II metabolite

A single ion M18 detected at *m/z* 670.3486 was found probably to be a glucuronide metabolite with supplementary oxidation, corresponding to the difference in mass of *m/z* 192.0270 with VPBO. This ion was only detected in liver during the treatment and depuration periods. The error on the measured mass was 1.49 ppm, which is low. Moreover, the retention time was 5.3 min, indicating that this ion eluted earlier than VPBO. The retention time of M18 supported the assumption of its identification as a glucuronide. In fact, glucuronide metabolites are classified as phase II metabolites and as a rule, offer weaker retention because of the high polarity of

Table 2
Peak area ratios between main metabolites of VPBO detected in muscle, liver, plasma and skin during treatment and during depuration.

Peak area ratios between main metabolites of VPBO	Treatment				Depuration			
	muscle	liver	plasma	skin	muscle	Liver	plasma	skin
M16/M1	11	1	24	4	63	6	273	21
M16/M17	57	356	17	33	16	25	9	29
M16/M18	23	12	105	10	15	5	28	11
M18/M17	2.5	30.2	0.2	3.3	1.1	5.2	0.2	2.6

the glucuronide part.

3.5. Comparative pharmacokinetic analysis of VPBO and major metabolite DLVPBO in rainbow trout

3.5.1. Uptake and depuration of VPBO in different tissues

Water bath exposure of rainbow trout in a tank containing 0.1 mg.L ^{1} of VPBO for one day did not lead to deaths. VPBO was well tolerated by the exposed rainbow trout. At each time point, matrices (muscle, plasma, skin, and liver) were sampled carefully to carry out the analysis of residues of VPBO in each matrix by the validated LC-HRMS method. The mean concentrations of VPBO (±SD, standard deviation) in muscle, plasma, skin, and liver are shown in Table 3.

During the uptake period, the mean VPBO concentrations in muscle and skin increased until the last sampling time point at 24 h (T4) and were measured at 99.9 µg kg ^{1} ±54.4 for muscle, and 263 µg kg ^{1} ±78.2 for skin. Unlike this increase, the highest concentrations for plasma and liver occurred at the first date of sampling at 2 h (T1) after the beginning of treatment. The concentrations were 567 µg.L ^{1} ±300 for plasma and 1846 µg kg ^{1} ±517 for liver. These levels decreased subsequently during the uptake period. At the end of the uptake period after 24 h, the highest concentration levels in matrices followed this order: liver > skin > muscle > plasma. The plasma concentrations decreased rapidly during this period from 567 µg.L ^{1} ±300 at T1 to 9.27 µg.L ^{1} ±7.35 at T4 (Supplementary Figure S3).

After placing the rainbow trout in a clean water bath for depuration, the concentrations in the tissues and plasma decreased gradually over the 64 days of depuration. At the end of this period, concentrations were still above the LOQ for muscle, skin and liver. VPBO was barely detectable in plasma, with concentrations below the LOQ at 5 days (T7) after withdrawal of treatment. The levels reached in muscle and skin were comparable after 33 days and were measured at 2.26 µg kg ^{1} ±0.48 for muscle and 2.85 µg kg ^{1} ±1.99 for skin at the end of the depuration period.

3.5.2. Pharmacokinetic analysis of VPBO and DLVPBO

Pharmacokinetic parameters were determined using sparse sampling non-compartmental analysis and are presented in Table 4 for VPBO in plasma and tissues and for DLVPBO in only muscle and skin, because it is edible tissue, and based on the calibration model of VPBO since no standard product is available for DLVPBO.

3.6. Parent VPBO

The maximum plasma concentration C_{max} (567 ± 301 µg.L ^{1}) after water bath treatment was reached at time T_{max} of 0.083 d (2 h) for VPBO, demonstrating rapid absorption. The apparent total body clearance (Cl_{tot}/F) was 0.34 L kg ^{1}. d ^{1} for plasma. The apparent volume of distribution at steady state (Vss/F) was 0.095 L kg ^{1}. The elimination half-life ($t_{1/2}$ λ_z) in plasma was short, (0.73 day) compared to other tissues. The area under the curve, AUC_{inf}, was calculated as 116 µg d.L ^{1}. The initial distribution of VPBO in tissues showed the highest concentration C_{max} in liver at 1847 µg kg ^{1} ± 211, at 99.9 µg kg ^{1} ± 22.2 in muscle, and at 264 µg kg ^{1} ± 35.9 in skin, occurring at T_{max} of 0.083 days (2 h) for liver, and at 1 d for muscle and 2 d for skin. AUC_{inf} in skin estimated at 2781 µg d.kg ^{1} was 2 and 2.75 times higher than in liver and muscle, respectively. The mean residence time (MRT_{inf}) was longer in skin and muscle, with values of 12.7 and 20.7 days respectively, compared to liver (5 days). The terminal elimination phase was the longest in muscle with a $t_{1/2}$ λ_z estimated at 17.1 days.

3.7. Main metabolite: DLVPBO

For the main metabolite identified, DLVPBO, the parameters were assessed only in muscle and skin (Table 4). The different pharmacokinetic profiles between the parent VPBO and the major metabolite DLVPBO are plotted in Fig. 2. The C_{max} values were lower for DLVPBO estimated at 31 µg kg ^{1} ± 3.8 in muscle and 70.6 µg kg ^{1} ± 9.0 in skin. A lower elimination rate of DLVPBO, and consequently a terminal elimination phase, was observed in muscle (22.5 days) compared to the elimination rate of VPBO (17.1 days). The mean residence time (MRT_{inf}) was estimated to be 43.1 days in muscle and 29.9 days in skin for DLVPBO, versus 20.7 days and 12.7 days for VPBO respectively. The computations of partial areas of VPBO and DLVPBO for different sampling times in skin showed systematically higher concentrations of parent compound compared to DLVBPO, in all period. However, in muscle, higher concentrations of DLVPBO were recovered after 17 days. (Fig. 3).

4. Discussion

This study assessed for the first time the metabolism, pharmacokinetics and tissue residues in rainbow trout exposed to VPBO dye in a water bath. During a preliminary test (data not shown), high toxicity of VPBO was observed for a dose at 0.8 mg.L ^{1}. Different concentrations of malachite green MG in bath treatment for aquaculture are depicted in the literature. The concern is always about the potential for human toxicity in the presence of malachite and leucomalachite green in fish tissues. Alderman and Clifton-Hadley (1993) exposed rainbow trout to 1.6 mg.L ^{1} of MG for 40 min, at two different temperatures. Máchová et al. (1996) applied treatment of rainbow trout at 0.2 mg.L ^{1} of MG for 6 days in a water bath. Bajc et al. (2011) chose to apply different doses ranging from 1 mg.L ^{1} to 1.5 mg.L ^{1} of waterborne MG for different exposure times (1 h or 3 h). These studies could only provide a guide for waterborne treatment of rainbow trout by triarylmethane-like dyes because no data could be retrieved for the administration of VPBO in aquaculture. However, in our previous metabolomics study, a dose of 0.05 mg.L ^{1} for rainbow trout exposed to VPBO for two days was applied following the experimental design by Dubreil et al. (2019b). The number of metabolites found in the metabolomics study was quite low (5 metabolites) compared to all those found in the *in vitro* study (15 metabolites). So a higher concentration was tested at 0.1 mg/L demonstrating notoxicity for the fish (Dubreil et al., 2019a, 2020b). The final dose

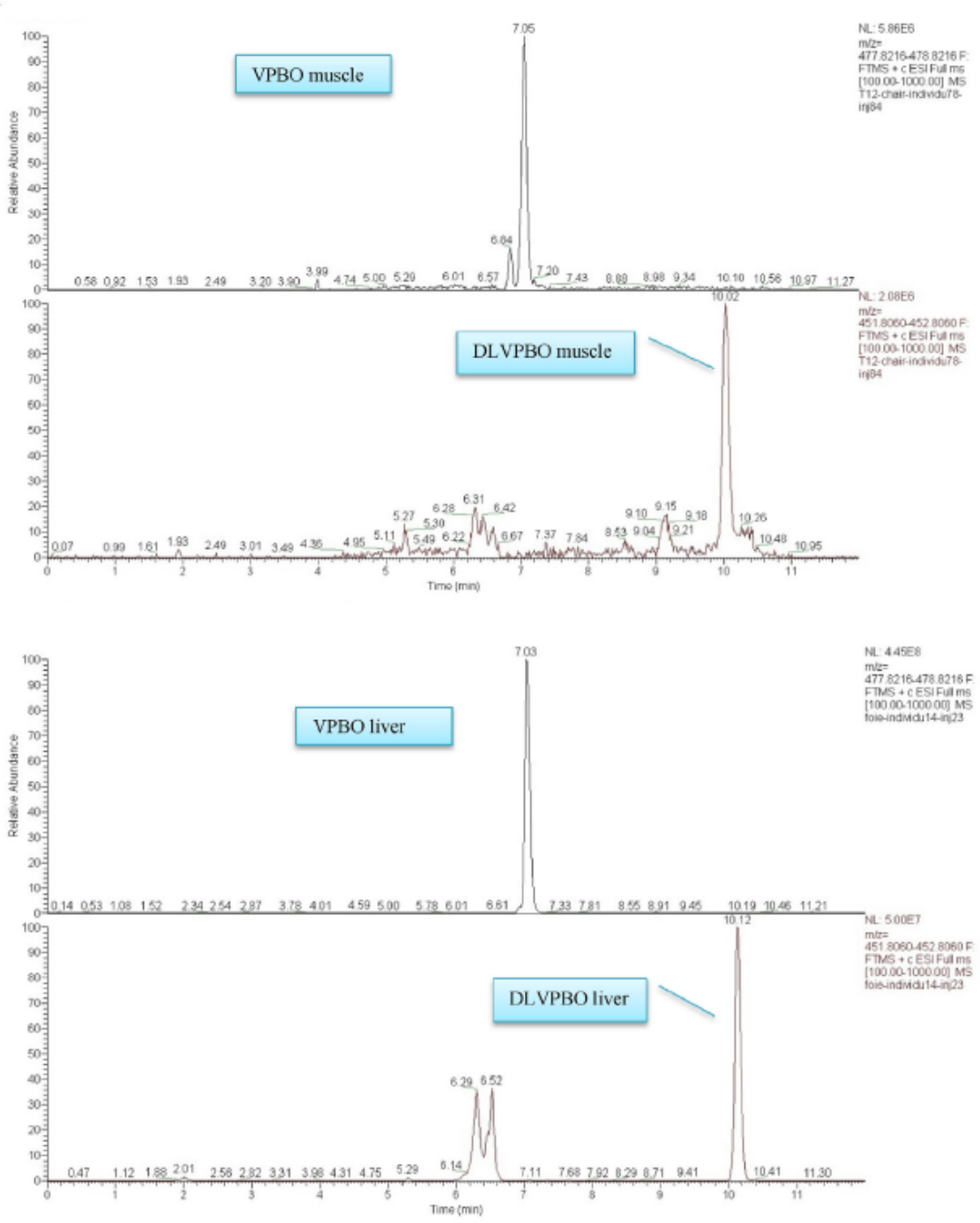


Fig. 1. Chromatogram of VPBO and principal metabolite M16 deethyl-leuco-VPBO (DLVPBO) in muscle (at T12), liver (at T14), skin (at T5), and plasma (at T3).

of 0.1 mg.L ^{1} of VPBO diluted in a water bath for one day was selected.

The first step in this study was to examine the metabolites obtained and potentially the main relevant metabolite, that could be even more persistent than the parent compound VPBO. The determination of a persistent metabolite as a marker residue is important to track administration of a treatment over time after fish exposure to the prohibited substance. In addition, this marker

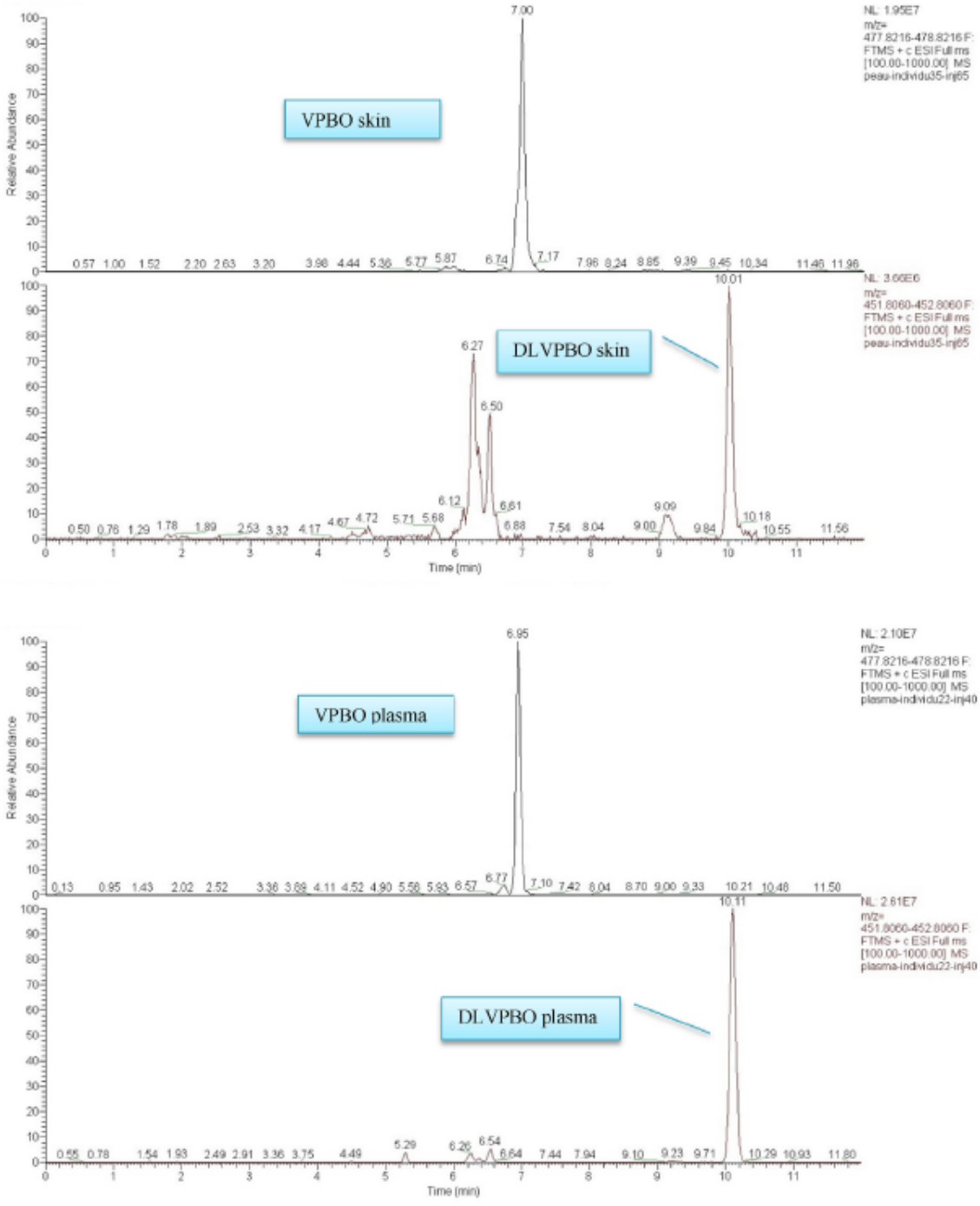


Fig. 1. (*continued*).

residue can be more toxic than the parent compound. Tacal and Özer (2007) found that the generation of triarylmethane metabolites did not alter the toxic load on exposed organisms because metabolites were at least as toxic as the parent compounds. Our *in vitro* metabolite investigation demonstrated that VPBO is biotransformed into 15 metabolites in the different biological tissues of rainbow trout, with in particular a greater amount of metabolites detected in liver (Dubreil et al., 2020b). During the treatment period in this study, the total amount of metabolites (expressed in peak area) followed this order: liver > skin ≅ plasma > muscle, whereas during the depuration period, the total amount of metabolites followed this order: liver > skin ≅ muscle > plasma. This estimated metabolic rate was in line with the rapid depuration by the liver found for other triarylmethane dyes with a similar

Table 3
Concentrations of VPBO in muscle, plasma, skin, and liver of rainbow trout after exposure to VPBO (n = 6 trout) at a dose of 40 mg.kg^{-1} b.w.

Date of treatment		Muscle µg.kg^{-1} (mean ± SD)	Plasma µg.L^{-1} (mean ± SD)	Skin µg.kg^{-1} (mean ± SD)	Liver µg.kg^{-1} (mean ± SD)
Uptake period (in days)					
T0	0	0	0	0	0
T1	0.083 d (2 h)	60.50 ± 13.34	566.64 ± 300.54	83.01 ± 27.26	1846.08 ± 517.26
T2	0.208 d (6 h)	77.86 ± 20.68	138.03 ± 101.29	174.98 ± 35.92	1468.48 ± 687.17
T3	0.417 d (10 h)	75.30 ± 39.94	32.15 ± 21.38	162.02 ± 49.08	825.21 ± 674.09
T4	1 d (24 h)	99.91 ± 54.43	9.27 ± 7.35	263.54 ± 78.17	300.32 ± 131.21
Depuration period (in days)					
T5	2 d	88.51 ± 44.72	1.83 ± 2.35	263.95 ± 88.03	67.29 ± 30.78
T6	3 d	38.39 ± 19.49	0.51 ± 0.37	219.05 ± 110.80	56.95 ± 44.93
T7	5 d	42.08 ± 13.82	<LOQ	115.68 ± 39.65	17.77 ± 8.41
T8	9 d	16.89 ± 7.79	<LOD	80.54 ± 45.34	8.67 ± 3.96
T9	17 d	16.01 ± 6.56	<LOQ	56.94 ± 29.82	3.24 ± 1.58
T10	34 d	8.52 ± 2.03	<LOQ	9.05 ± 5.22	2.17 ± 1.00
T11	49 d	6.02 ± 2.73	<LOD	6.42 ± 2.54	2.89 ± 3.30
T12	65 d	2.26 ± 0.48	<LOD	2.85 ± 1.99	0.60 ± 0.39

Table 4
Pharmacokinetic parameters of VPBO determined by sparse sampling non-compartmental analysis in rainbow trout tissue and plasma, and of metabolite DLVPBO in muscle and skin after a water bath of rainbow trout in a bath containing 40 mg.kg^{-1} b.w. Of VBPO for 24 h.

	Parent VPBO				DLVPBO	
	liver	plasma	muscle	skin	muscle	skin
λ_z (d^{-1})	0.0443	0.9451	0.0406	0.0634	0.0310	0.0384
$T_{1/2}$ λ_z (d)	15.6	0.73	17.1	10.9	22.5	18.1
AUC_{last} (µg.d.L^{-1} or kg^{-1}) ±SEM	1406 ± 130	116 ± 17	955 ± 57$^{(a)}$	2736 ± 219$^{(a)}$	945 ± 64$^{(a)}$	2528 ± 143$^{(a)}$
AUC_{inf} (µg.d.L^{-1} or kg^{-1})	1420	116	1010	2781	1175	2780
AUC_{extrap} (%)	0.96	0.17	5.52	1.62	19.53	9.72
Cl_{tot}/F (L.kg^{-1}.d^{-1})	0.0281	0.34	0.0396	0.0144	0.0334	0.0143
MRT_{inf} (d)	5.03	0.28	20.7	12.7	43.1	29.9
Vss/F (L.kg^{-1})	0.142	0.095	0.819	0.183	1.46	0.430
T_{max} (d)	0.083	0.083	1.00	2.00	2.00	17.0
C_{max} (µg.L^{-1} or kg^{-1}) ±SEM	1847 ± 211	567 ± 123	99.9 ± 22.2$^{(b)}$	264 ± 35.9$^{(b)}$	31.0 ± 3.8$^{(b)}$	70.6 ± 9.0$^{(b)}$

λ_z first order rate constant associated with the terminal portion of the curve; $T_{1/2}$ λ_z: terminal half-life; AUC_{last}: area under the curve (AUC) from time of dosing (0) to the time of the last quantifiable concentration (i.e. above LOQ); AUC_{inf}: AUC extrapolated from time of dosing (0) to infinity; AUC_{extrap}: percentage of AUC_{inf} that is due to extrapolation from T_{last} to infinity; Cl: clearance; MRT_{inf}: MRT extrapolated to infinity using the last quantifiable concentration for extrapolation; Cl_{tot}/F: total body clearance; Vss/F: volume of distribution at steady state; T_{max}: time of maximum tissue or plasma concentrations; C_{max}: maximum tissue or plasma concentrations. Standard error of the mean (SEM) was estimated for C_{max} and AUC_{last}. (a): not statistically significantly different ($p > 0.05$) between VBPO and DLVBPO. (b): statistically significantly different ($p \leq 0.05$) between VBPO and DLVBPO.

structure (Plakas et al., 1996; Decroos et al., 2009). Furthermore, high levels of total MG residues in the liver of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) for two weeks after waterborne exposure to a C^{14}-MG solution were reported by Plakas et al. (1996). In addition, the liver, along with the gills, is an organ of major importance in the ecotoxicology of fish due to its high metabolic capacities and its crucial role in detoxification (Gomez et al., 2010). In this study, VPBO was metabolized particularlyinto M16, M15 and M17 in muscle, plasma and skin during the depuration period, as well as into M16 and M17 in the liver. These metabolites correspond to *m/z* 452,3060 (M16, proposed as N-deethyl-leuco VPBO or DLVPBO), *m/z* 408.2069 (M15, proposed as N-oxidated dehydrogenated triple N-deethyl VPBO), and *m/z* 480,3373 (M17, proposed as leuco-VPBO). The metabolites found (the main metabolite and the others identified), suggest that dealkylation (deethylation) and double-bound reduction are major metabolic pathways. The M16 was also found in our previous metabolomics study (Dubreil et al., 2019b), ranking first in muscle, and third in the liver. In the same metabolomics study, the M17 was also detected, ranking first in the liver, but not detected in muscle, whereas it was detected in high amounts in the present study in muscle. Similar pathways of dealkylation and oxidation for MG were described by Doerge et al. (1998), showing that levels of leucoMG in edible tissues of fish exceeded those of MG, and consequently confirmed that leuco-MG was a relevant residue marker for regulatory determination of MG misuse. In this study on VPBO, a substance derived from a triarylmethane structure similar to MG, we found that the metabolite leading to the highest signal intensity in all biological matrices was M16, proposed as DLVPBO.

The assessment of pharmacokinetic parameters was first carried out for the parent compound. During the uptake period, the concentration of VPBO in plasma and liver increased rapidly, and concentrations were the highest at the beginning of the treatment, suggesting efficient uptake by the gills, and to a lesser degree by skin then muscle. The role of the gills in the uptake of MG, a similar triarylmethane dye, was described for the first time by Poe and Wilson (1983). The high concentration of VPBO in liver was directly associated to the role of liver, where hepatic biotransformation directly relates to bioaccumulation of lipophilic contaminants in fresh water fish (Schultz et al., 1999). Moreover, an increase in concentrations was observed at the end of the uptake period for muscle and skin, probably due to reabsorption of VPBO via excrements eliminated in the closed water bath. To the best of our knowledge, no data are available on the level of VPBO after treatment in fish for comparison. During our study, a rapid decline of VPBO was observed in plasma. The elimination half-life was calculated as 0.73 days (around 18 h) in plasma. For Alderman and Clifton-Hadley (1993) determined $t_{1/2}$ λ_z of trout plasma to be 0.62 days at 8 °C, and 14.5 days at 16 °C, so a longer elimination rate with the increasing of temperature. In the present study, rainbow trout

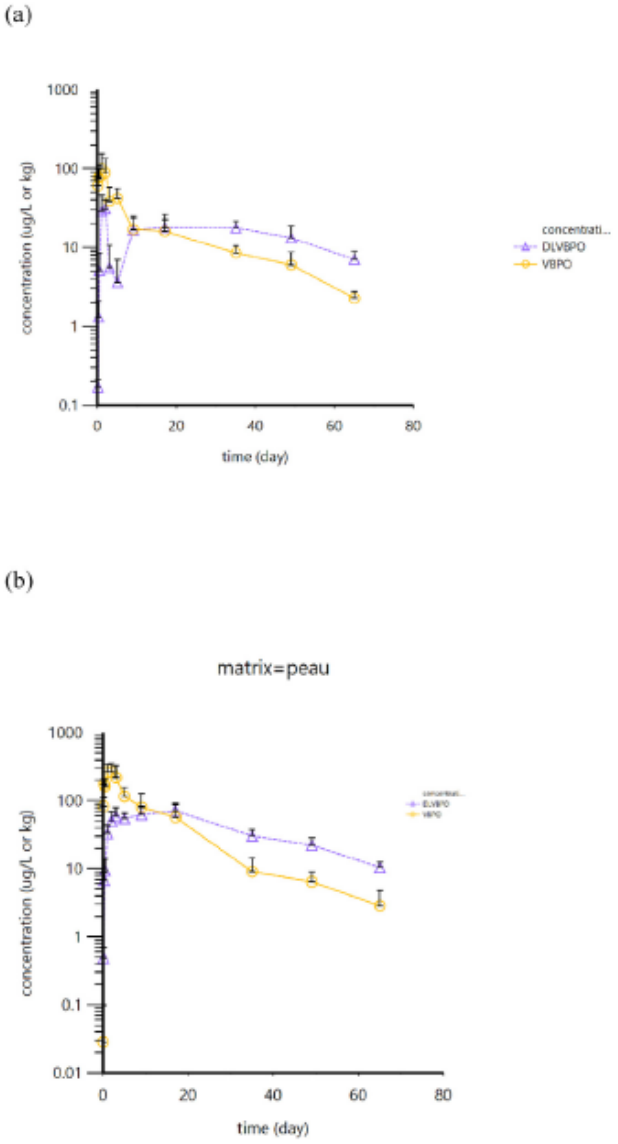


Fig. 2. Concentration profile of VPBO and DLVPBO in rainbow trout muscle (a) and skin (b) after water bath with VBPO at a dose of 40 mg.kg^{-1} b. w.

were kept at 13 °C in a water bath, and temperature has been described elsewhere as a key factor for the elimination of MG as well as other environmental factors (Lanzing, 1965). VPBO tends to be eliminated faster than MG around the same temperature, presumably because it is bio-transformed into a broader panel of metabolites. In tissues, the decrease in VPBO concentrations was slower than in plasma. Our results show that the mean residence time of VPBO in muscle and skin, was higher than in liver and plasma.

For the major metabolite identified, DLVPBO, the amount of metabolite (in peak area) was converted in concentration considering the same analytical response than the parent VPBO; the concentrations were assessed only for muscle and skin in order to estimate pharmacokinetic parameters for DLVPBO in the edible matrix that need a definition of residue marker. The estimated C_{max} values in muscle and skin were three and eight times lower than those of the parent compound, respectively but mean residence times were higher for the metabolite. In fact, LVPBO tend to decrease more slowly than its parent molecule taking into account the biologic variability. The elimination half-life in muscle and skin was slightly higher compared to VPBO, which confirmed the same fate of DLVPBO as the main metabolite of MG (LMG). In fact, Plakas et al. (1996) demonstrated that MG and LMG half-lives in catfish muscle were 2.8 and 10 days, respectively. MG and LMG were also more persistent in muscle than in plasma, with a major role of metabolism in the clearance of the parent compound. The difference in elimination rates between the parent compound MG and its metabolite residue marker LMG seems more pronounced than for VPBO and DLVPBO. This could be due to lipid content because in the Plakas et al. (1996) study, the model was evaluated for catfish, which is a fattier fish species than rainbow trout, and LMG accumulates in fat. In addition, MG is less lipophilic than VPBO (log P (MG) = 0.62 and estimated log P (VPBO) = 4.06). Fat content has actually been proven to act on metabolite levels. In a study on carp and trout, Jiang et al. (2009) found that there was a difference between three common freshwater fish, *Parabramispekinensis* (plant-eating fish), *Carassiusauratus* (omnivorous fish) and *Ophiocephalusargus* (carnivorous fish), with LMG levels significantly correlated with lipid content in fish tissue. In our study, the rainbow trout were not very fatty, weighing a mean of 117 g at the start and 232 g at the end of the experiment. As a result, differences could be found for the depuration rates of VPBO and DLVPBO in other fatty fish.

The time needed for the metabolite DLVPBO concentration to decrease below to the LOQ (LOQ = 0.5 µg kg ^{1}) was 149 days in edible muscle tissue, whereas it appears to be shorter for VPBO (110 days). It may be beneficial to investigate this tendency in other fish species. Our results, showing longer persistence of the DLVPBO metabolite in muscle and especially in skin, compared to parent VPBO, are of particular interest. The concentrations found in the skin highlighted that monitoring of VPBO for food safety or environmental contamination should not dissociate the muscle from the skin. This study demonstrated that the bioaccumulation of VPBO and some metabolite residues in edible fish tissues is an important aspect for consumer's health regulatory agencies should be aware of. However, these results should be interpreted with caution to take into account the *in vivo* variability. It would be necessary to produce a toxicological assessment of DLVPBO in order to propose definitely the sum of VPBO and DLVPBO as the relevant residue marker of an illegal treatment by VPBO in farmed rainbow trout.

5. Conclusion

The results of the current study demonstrate that VPBO is rapidly absorbed and well distributed in rainbow trout muscle, skin, and liver, after water bath administration for one day. VPBO is then rapidly converted into 15 metabolites, with one metabolite found to be more intense and persistent, proposed as deethyl-leuco-VPBO (DLVPBO). These results highlight the key role played by the liver in the metabolism of VPBO. A depuration period of 60 days enabled us to compare the pharmacokinetic profiles of VPBO and DLVPBO. The metabolic profiles showed that the parent drug VPBO occurs at higher concentrations in muscle and skin at the start of the uptake period, but its concentrations fall below those of DLVPBO in muscle after 17 days. At 60 days of depuration, the concentrations of VPBO in muscle and skin (mean of 2.5 µg kg ^{1}) are still slightly above the limit of quantification of 0.5 µg kg ^{1}, whereas concentrations of the DLVPBO metabolite were found to be a mean of 8.8 µg kg ^{1} in the same tissues. For these reasons, VPBO and its major metabolite DLVPBO, an appropriate residue marker,

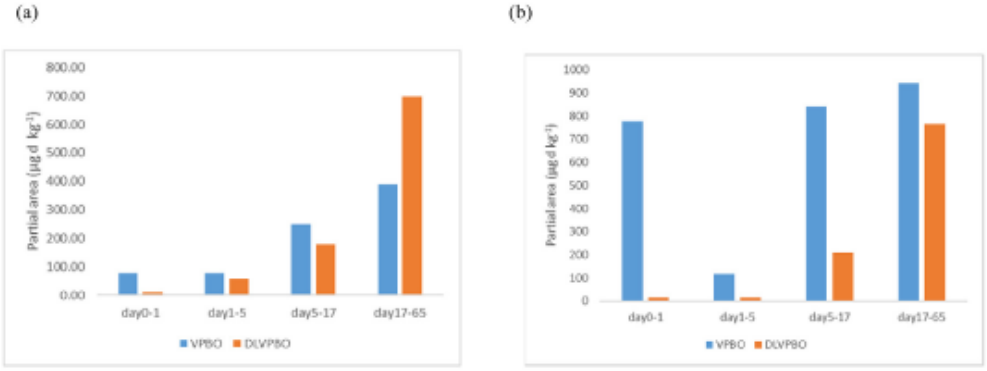


Fig. 3. Partial area (µg.day.kg^{-1}) of VPBO and DLVPBO for different time points in rainbow trout muscle (a) and skin (b).

should both be monitored without dissociating adhering skin, for effective residue control.

Author contribution statement

E.D. and E.V. conceived the study. E.V. supervised the project and supervised the findings of this work. P.S. and D. H–P. helped supervise the project. E.D. and M.L. developed the theory and performed the computations. D.H–P. encouraged E.D. to investigate the metabolism aspect and PS the pharmacokinetics aspect. E.D. and J-M.D. carried out the analytical experiment. J-M.D. carried out the sample preparation. J-M. D and E.D. verified the analytical methods. M.D. and T.M. carried out the animal experiment. E.D., M.D. and T.M. designed and planned the animal experiment and M.D. performed the experiments. M.L., A.V. and P.S. performed the pharmacokinetics computations. M.L., A.V., P.S. contributed to the interpretation of the results. E.D. wrote the manuscript with support from M.L., A.V. and E.V. All authors provided critical feedback and helped shape the research, analysis and manuscript.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgement

The authors thank the European Commission Directorate-General for Health and Food Safety (European contribution to the European Union Reference Laboratory SI2.726842 & SI2.777451), which enabled this work to be carried out.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127636.

References

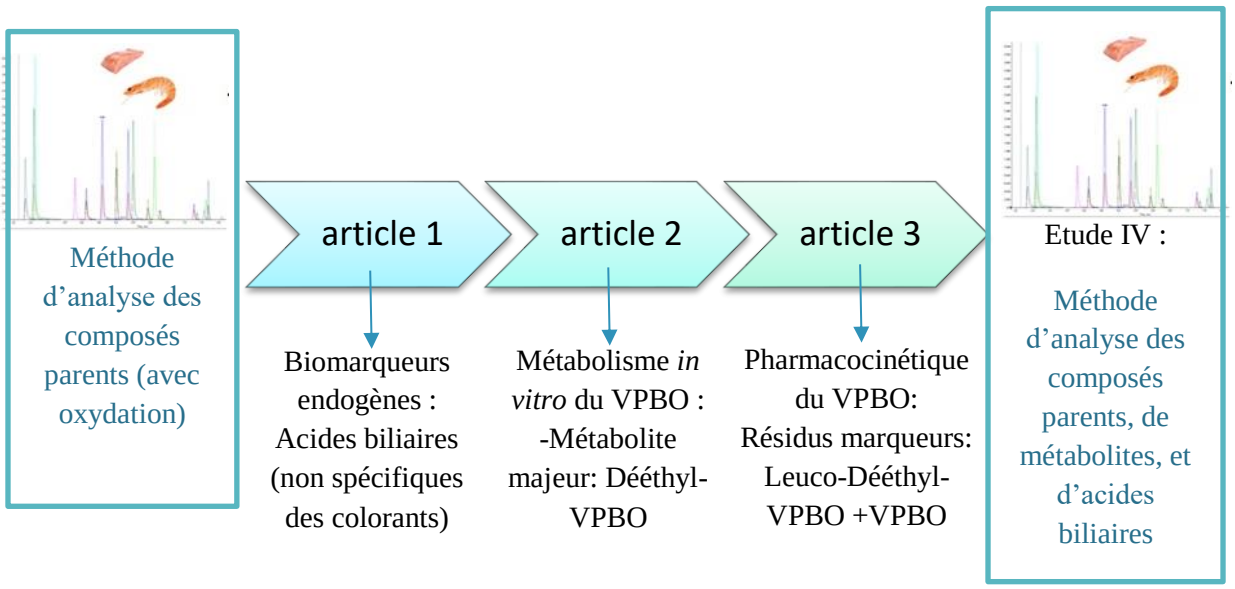
Alderman, D.J., 1982. In vitro testing of fisheries chemotherapeutants. J. Fish. Dis. 5, 113–123.
Alderman, D.J., 1985. Malachite green: a review. J. Fish. Dis. 8, 289–298.
Alderman, D.J., Clifton-Hadley, R.S., 1993. Malachite green: a pharmacokinetic study in rainbow trout, Oncorhynchus mykiss (Walbaum). J. Fish. Dis. 16, 297–311.
Bajc, Z., Jenčič, V., Šinigoj Gačnik, K., 2011. Elimination of malachite green residues from meat of rainbow trout and carp after water-born exposure. Aquaculture 321, 13–16.
Bergwerff, A.A., Kuiper, R.V., Scherpenisse, P., 2004. Persistence of residues of malachite green in juvenile eels (Anguilla anguilla). Aquaculture 233, 55–63.
Culp, S.J., Blankenship, L.R., Kusewitt, D.F., Doerge, D.R., Mulligan, L.T., Beland, F.A., 1999. Toxicity and metabolism of malachite green and leucomalachite green during short-term feeding to Fischer 344 rats and B6C3F1 mice. Chem. Biol. Interact. 122, 153–170.
CVMP, 1998. Establishment of Maximum Residue Limits for Salmonidae and Other Fin Fish.
Decroos, C., Li, Y., Bertho, G., Frapart, Y., Mansuy, D., Boucher, J.L., 2009. Oxidative and reductive metabolism of tris(p-carboxyltetrathiaaryl)methyl radicals by liver microsomes. Chem. Res. Toxicol. 22, 1342–1350.
Dervilly-Pinel, G., Chereau, S., Cesbron, N., Monteau, F., Le Bizec, B., 2015. LC-HRMS based metabolomics screening model to detect various β-agonists treatments in bovines. Metabolomics 11, 403–411.
Doerge, D.R., Churchwell, M.I., Gehring, T.A., Pu, Y.M., Plakas, S.M., 1998. Analysis of malachite green and metabolites in fish using liquid chromatography atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom. 12, 1625–1634.
Dubreil, E., Mompelat, S., Kromer, V., Guitton, Y., Danion, M., Morin, T., Hurtaud-Pessel, D., Verdon, E., 2020a. Corrigendum to "Dye residues in aquaculture products: targeted and metabolomics mass spectrometric approaches to track their abuse [Food Chem. 294 (2019) 355–367]. Food Chem. 306, 125539.
Dubreil, E., Mompelat, S., Kromer, V., Guitton, Y., Danion, M., Morin, T., Hurtaud-Pessel, D., Verdon, E., 2019. Dye residues in aquaculture products: targeted and metabolomics mass spectrometric approaches to track their abuse. Food Chem. 294, 355–367.
Dubreil, E., Sczubelek, L., Burkina, V., Zlabek, V., Sakalli, S., Zamaratskaia, G., Hurtaud-Pessel, D., Verdon, E., 2020b. In vitro investigations of the metabolism of Victoria pure blue BO dye to identify main metabolites for food control in fish. Chemosphere 238.
EFSA, Penninks, A., Baert, K., Levorato, S., Binaglia, M., 2017. Dyes in aquaculture and reference points for action. EFSA J. 15, e04920.
Gallart-Ayala, H., Chéreau, S., Dervilly-Pinel, G., Bizec, B.L., 2015. Potential of mass spectrometry metabolomics for chemical food safety. Bioanalysis 7, 133–146.
Gessner, T., Mayer, U., 2000. Triarylmethane and diarylmethane dyes. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry.
Gomez, C.F., Constantine, L., Huggett, D.B., 2010. The influence of gill and liver metabolism on the predicted bioconcentration of three pharmaceuticals in fish. Chemosphere 81, 1189–1195.
Hubert, P., Nguyen-Huu, J.J., Boulanger, B., Chapuzet, E., Chiap, P., Cohen, N., Compagnon, P.A., Dewé, W., Feinberg, M., Lallier, M., Laurentie, M., Mercier, N., Muzard, G., Nivet, C., Valat, L., 2004. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: a SFSTP proposal - Part I. J. Pharmaceut. Biomed. Anal. 36, 579–586.
Hubert, P., Nguyen-Huu, J.J., Boulanger, B., Chapuzet, E., Chiap, P., Cohen, N., Compagnon, P.A., Dewé, W., Feinberg, M., Lallier, M., Laurentie, M., Mercier, N., Muzard, G., Nivet, C., Valat, L., Rozet, E., 2007a. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal - Part II. J. Pharmaceut. Biomed. Anal. 45, 70–81.
Hubert, P., Nguyen-Huu, J.J., Boulanger, B., Chapuzet, E., Cohen, N., Compagnon, P.A., Dewé, W., Feinberg, M., Laurentie, M., Mercier, N., Muzard, G., Valat, L., Rozet, E., 2007b. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal-Part III. J. Pharmaceut. Biomed. Anal. 45, 82–96.
Jiang, Y., Xie, P., Liang, G., 2009. Distribution and depuration of the potentially

carcinogenic malachite green in tissues of three freshwater farmed Chinese fish with different food habits. Aquaculture 288, 1–6.
Kwan, P.P., Banerjee, S., Shariff, M., Yusoff, F.M., 2020. Persistence of malachite green and leucomalachite green in red tilapia (Oreochromis hybrid) exposed to different treatment regimens. Food Contr. 108.
Lanzing, W.J.R., 1965. Observations on malachite green in relation to its application to fish diseases. Hydrobiologia 25, 426–441.
Lewis, L.M., Indig, G.L., 2002. Effect of dye aggregation on triarylmethane-mediated photoinduced damage of hexokinase and DNA. J. Photochem. Photobiol. B Biol. 67, 139–148.
Lewis, L.M., Indig, G.L., 2001. Photonuclease activity of mitochondrial triarylmethane photosensitizers. Pharmaceut. Pharmacol. Lett. 11, 22–25.
Máchová, J., Svobodová, Z., Svobodník, J., Piačka, V., Vykusová, B., Kocová, A., 1996. Persistence of malachite green in tissues of rainbow trout after a long-term therapeutic bath. Acta Vet. 65, 151–159.
Ngan, D.K., Ye, L., Wu, L., Xia, M., Rossoshek, A., Simeonov, A., Huang, R., 2019. Bioactivity signatures of drugs vs. Environmental chemicals revealed by Tox21 high-throughput screening assays. Front. Big Data 2.
Okocha, R.C., Olatoye, I.O., Adedeji, O.B., 2018. Food safety impacts of antimicrobial use and their residues in aquaculture. Publ. Health Rev. 39.
Plakas, S.M., El Said, K.R., Stehly, G.R., Gingerich, W.H., Allen, J.L., 1996. Uptake, tissue distribution, and metabolism of malachite green in the channel catfish [Ictalurus punctatus]. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 53, 1427–1433.
Poe, W.E., Wilson, R.P., 1983. Absorption of malachite green by channel catfish. Prog. Fish-Cult. 45, 228–229.
RASFF-portal. European Commission. https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/.
Schnick, R.A., 1988. The impetus to register new therapeutants for aquaculture. Prog. Fish-Cult. 50, 190–196.
Schultz, I.R., Hayton, W.L., 1999. Interspecies scaling of the bioaccumulation of lipophilic xenobiotics in fish: an example using trifluralin. Environ. Toxicol. Chem. 18, 1440–1449.
Srivastava, S., Sinha, R., Roy, D., 2004. Toxicological effects of malachite green. Aquat. Toxicol. 66, 319–329.
Sudova, E., Machova, J., Svobodova, Z., Vesely, T., 2007. Negative effects of malachite green and possibilities of its replacement in the treatment of fish eggs and fish: a review. Vet. Med. 52, 527–539.
Tacal, O., Özer, I., 2007. An assessment of the role of intracellular reductive capacity in the biological clearance of triarylmethane dyes. J. Hazard Mater. 149, 518–522.
Verdon, E., Bessiral, M., Chotard, M.P., Couëdor, P., Fourmond, M.P., Fuselier, R., Gaugain, M., Gautier, S., Hurtaud-Pessel, D., Laurentie, M., Pirotais, Y., Roudaut, B., Sanders, P., 2015. The monitoring of triphenylmethane dyes in aquaculture products through the European Union network of official control laboratories. J. AOAC Int. 98, 649–657.

Etude IV : Développement analytique issu des travaux menés sur le métabolisme: résultats préliminaires

1.1 Introduction

L'objectif de cette étude, qui a démarrée par un stage de Master 1 de 3 mois, était de tester l'intérêt et la faisabilité d'un développement de méthode incluant le ou les métabolites pertinents des études précédemment présentées. Le sujet portait donc sur un développement et une validation de méthode d'analyse multi-résidus de colorants dans les poissons d'aquaculture par LC-MS/MS, pouvant inclure les composés parents de colorants mais aussi des résidus marqueurs tels que leurs métabolites, ou des composés endogènes potentiellement marqueurs de traitement chez le poisson. Si l'on reprend le fil conducteur de cette thèse, l'amélioration de la surveillance des colorants dans les produits d'aquaculture pour faire face aux pratiques d'élevage interdites, ce développement rassemble les connaissances du travail accompli et offre de nouvelles perspectives de contrôle :



Le deuxième objectif de cette étude consistait à évaluer la sensibilité de la méthode pour détecter des composés interdits d'usage à des niveaux résiduels règlementairement acceptables. En effet, aujourd'hui en 2020, il est important de mettre au point une méthode d'analyse de ces colorants permettant de les détecter et de les identifier à une concentration atteignant 0.5 µg/kg, au moins pour les colorants principalement règlementés. Ce projet a permis de réaliser la mise au point des paramètres de spectrométrie de masse (réalisation d'infusions), l'optimisation de la séparation chromatographique (test de colonnes, de phases mobiles, de solvants de reprise…) puis l'optimisation de l'étape d'extraction dans la chair de poissons. Enfin, la méthode développée a été testée sur des échantillons de poissons d'aquaculture collectés dans le commerce local, ainsi que sur un échantillon officiel détecté positif en MG/LMG par un laboratoire de contrôle départemental. Le développement n'est pas encore finalisé à l'heure actuelle.

1.2 Matériel et Méthode

Colorants : Une liste de 14 colorants avec 4 leuco-bases a été établie pour cette étude ainsi que des standards internes deutérés du CV, MG, LCV et LMG. Les 4 leuco-bases inclues sont :
-LMG, leuco-base de MG

-LCV, leuco-base de CV

-LBG, leuco-base de BG, son standard analytique a été synthétisé par une société privée pour l'étude,

- et DLVPBO pour lequel seulement les transitions ioniques ont été inclues dans la méthode. En effet, la synthèse du standard n'étaient pas possible car l'identification structurale n'a pas été réalisée, car elle nécessiterait d'isoler suffisamment de DLVPBO de la matrice poisson pour effectuer des analyses structurales plus poussées (RMN, Infra-rouge),

Trois acides biliaires (l'acide taurodésoxycholique (TRDA), l'acide désoxycholique (DCA) et l'acide glycodésoxycholique (GCDA) ont également été insérés dans la méthode à titre expérimental dans un premier temps. En cas d'échantillons positifs en colorants, cela permettrait de corréler la présence du colorant à la concentration d'acides biliaires, mais Cela nécessite d'obtenir un grand nombre d'échantillons positifs.

Les solutions mères sont préparées à 100 mg/l dans les solvants de dilution appropriés (MeOH ou ACN).

Tableau 13 : Colorants et marqueurs de traitement inclus dans le développement

Famille	**Colorants**	**Résidu marqueur : Métabolite direct/métabolite endogène (de la truite)**
Triarylméthanes	Vert de Malachite (MG)	Leuco Malachite Green (LMG)
	Vert Brillant (BG)	Leuco Vert Brillant (LBG)
	Cristal Violet (CV)	Leuco Cristal Violet (LCV)
	Ethyl Violet (EV)	
	Pararosaniline (PRRA)	
Dérivés des Triarylméthanes	Victoria Blue B (VBB)	
	Victoria Blue R (VBR)	
	Victoria Pure Blue BO (VPBO)	Leuco dééthyl VPBO (DLVPBO)
Phénothiazines	Methylene Blue (MB)	Azure B (AZB)
	New Methylene Blue (NMB)	
Phenoxazines	Nile Blue A (NBA)	
Xanthènes	Rhodamine 6G (RHG)	
	Rhodamine B (RHB)	
Acides biliaires		TRDA
		GCDA
		DCA

Matériel : solvants pour l'extraction et la LC-MS/MS de pureté appropriée, matériel d'extraction et de purification, évaporateur sous azote, centrifugation.

Tableau 14 : Colonnes chromatographiques testées

Fournisseur	**Colonne**	**Dimension**	**Taille de particule**	**Taux de carbone**	**End-Caping**	**Technologie**
Waters	Sunfire C18	150*2.1mm	3.5 µm	16 %	Oui	Spherical Particle
Thermo Scientific	Accucore Phenyl Hexyl	100*2.1mm	2.6 µm	5 %	Oui	Spherical Solid Core
Sigma-Aldrich	Ascentis Express C18	100*2.1mm	2.7µm	/	Oui	Fused-Core
Phenomenex	Kinetex Polar C18	150*2.1mm	2.6µm	12 %	Oui	Core Shell Silica
Agilent	Zorbax RX-C8	150*2.1mm	5µm	5.5 %	Non	Porous silica microspheres

Appareil de LC-MS/MS : chaine LC Surveyor couplée au TSQ Quantum Ultra (ThermoFisher)

1.3 Résultats de développement

Mise au point d'infusion

La réalisation d'infusion nous a permis de définir le « tube lens » et l'énergie de collision optimaux en identifiant pour chaque molécule 2 transitions majeures et une seule transition pour les acides biliaires, suffisante pour leur quantification. Cette première détection par spectrométrie de masse est réalisée par une infusion d'une solution des composés à 100 µg/L dans l'ACN acidifié. Une boucle d'optimisation est insérée sur le spectromètre afin de pouvoir infuser les solutions par l'intermédiaire d'une seringue.

Il faut noter ici que les ions formés dans la source sont des ions pseudo-moléculaire $[M+H]^+$ ou $[M]^+$ pour les colorants déjà chargés positivement, comme MG ou CV. Les ions sont donc détectés en mode électrospray ESI+. Cependant, pour les acides biliaires, il s'agit d'une détection des ions adduits $[M+NH_4]^+$ en raison de la formation d'un complexe avec l'acétate d'ammonium. Les acides biliaires sont par ailleurs couramment détectés en mode électrospray négatif ce que nous avons toutefois décidé de ne pas appliquer. Les transitions MRM des composés se trouvent en **annexe 1** et celles des standards internes en **annexe 2**.

Optimisation des paramètres de spectrométrie de masse en tandem

Cette opération d'optimisation des gaz est réalisée afin de trouver le bon compromis pour nébuliser et désolvater la solution contenant les ions à analyser. Ici, l'optimisation est réalisée par un système de T, en introduisant dans la seringue une solution de colorant à 100 µg/L en même temps que la phase mobile au débit qui sera utilisé.

Tableau 15 : Paramètres de gaz optimisés

Spray Voltage	3500
Sheath Gas Pressure	30 (unité arbitraire)
Ion Sweep Gas Pressure	5 (unité arbitraire)
Aux Gas Pressure	10 (unité arbitraire)
Capilary Temperature	350 °C

Optimisation de la chromatographie liquide

Les tests de gradient ont été réalisés sur toutes les molécules. Cependant, en raison du grand nombre de données, les résultats seront présentés pour le colorant AZB avec la colonne Ascentis

Express C18 (Sigma) (**Figure 30)**. La phase aqueuse utilisée est « Eau + 10 mM acétate d'ammonium + 0.1 % d'acide formique » et la phase organique est « ACN». Les premiers tests n'ont pas été très concluant. En effet, sur le premier chromatogramme (A), le temps de rétention de AZB se trouve dans le temps mort de la colonne (1.63 min). En ajustant le gradient et le temps de passage en phase organique, les temps de rétentions ont été décalés à 2.33 min (B,C) cependant, les pics étaient assez larges et mal résolus. Pour pallier à ce problème, une autre colonne a été mise en place : il s'agit de la colonne Sunfire (Waters) **(Figure 31)**.

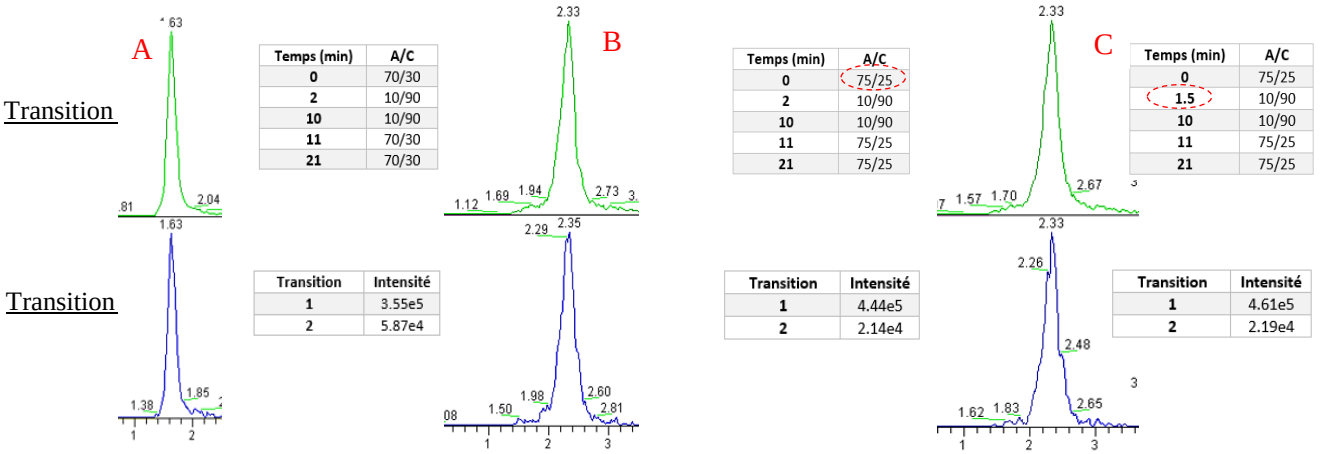


Figure 30 : Chromatogrammes obtenus pour AZB avec la colonne Ascentis Express C18 (Sigma)

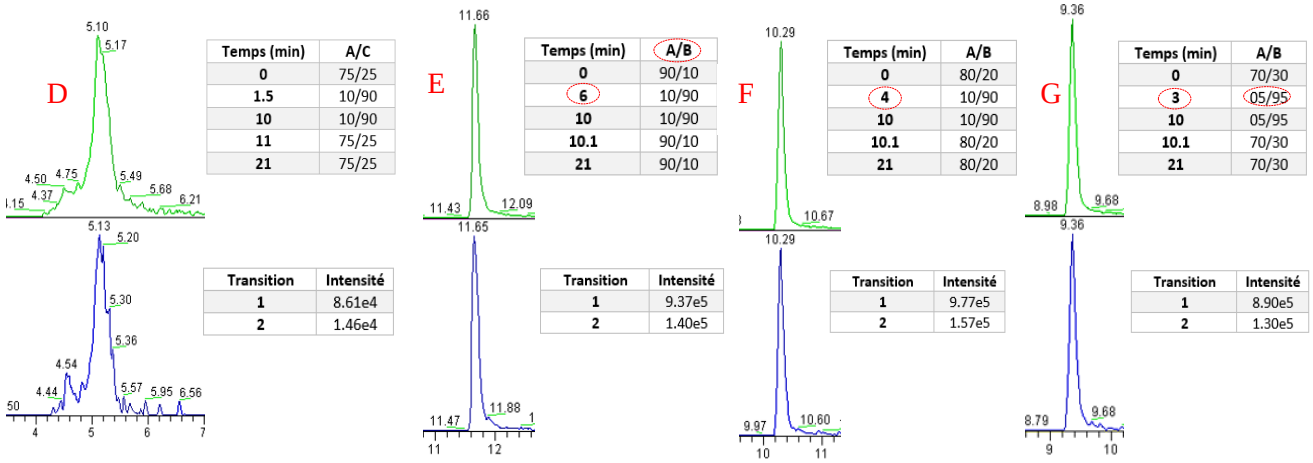


Figure 31 : Chromatogrammes obtenus pour AZB avec la colonne Sunfire "Waters"

En raison de pics mal résolus et de temps de rétention trop court (A, B, C), la colonne Sunfire de chez Waters a été testée car elle a été choisie lors d'une ancienne étude sur BG. Sur les chromatogrammes (D, E, F, G), un changement de phase mobile a été réalisé mais aussi la vitesse de passage en phase organique (gradient d'élution). Nous avons observé qu'il est

optimal d'utiliser le MeOH comme phase organique avec un temps de passage en phase organique de 3 minutes pour avoir des pics bien résolus et des temps de rétentions satisfaisants. Pour pousser les recherches, une autre colonne avec une nouvelle technologie a été testée afin de comparer les résultats obtenus avec la colonne Sunfire de chez Waters : il s'agit de la colonne Accucore Phenyl Hexyl de chez Thermofisher (**Figure 32)**.

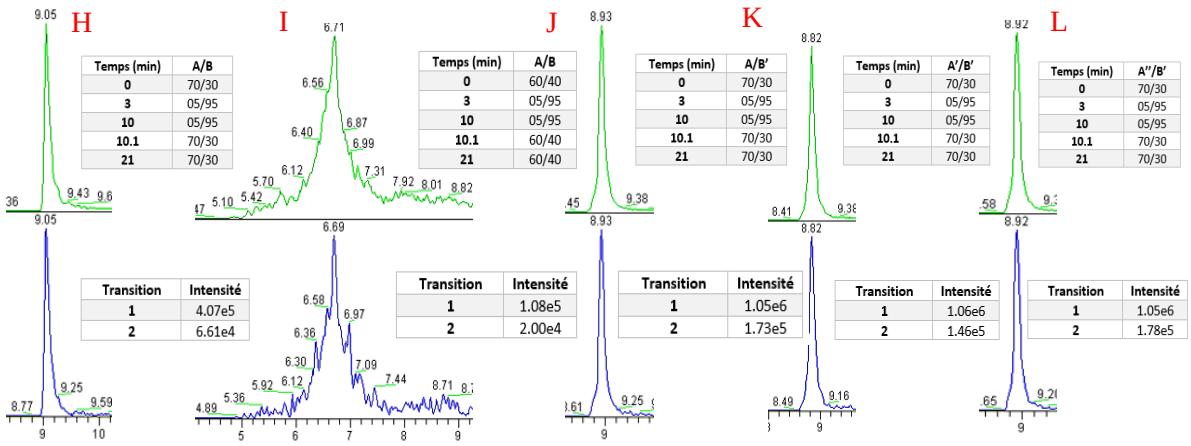


Figure 32 : Chromatogrammes obtenus pour AZB avec la colonne Accucore Phenyl Hexyl (Thermo)

D'autre tests de gradients ont été réalisés avec la colonne Accucore Phenyl Hexyl. D'après les chromatogrammes (H, I, J), le meilleur gradient optimal que nous avons sélectionné est le (J). Cette colonne a donc été choisie pour le début de notre phase de développement du protocole d'extraction. Cependant, au cours de notre développement de méthode, un problème chromatographique a été constaté durant les tests de gammes. Trois molécules (MB, NBA et NMB) interféraient avec la colonne Accucore Phenyl Hexyl en laissant paraitre sur les chromatogrammes des trainées de pics (**Figure 33**). Ceci est dû à une interaction liée avec les molécules et la silice résiduelle (non greffée) de la colonne. Pour résoudre ce problème rencontré, un changement de colonne a été réalisé en adoptant la **colonne Sunfire** (Waters). Cette nouvelle colonne a été choisi en raison de ses chromatogrammes satisfaisant obtenus lors de l'optimisation de la colonne. Un nouveau gradient **(Tableau 16)** a été définis pour avoir des pics bien résolus dans un intervalle de temps de 7 à 13 min.

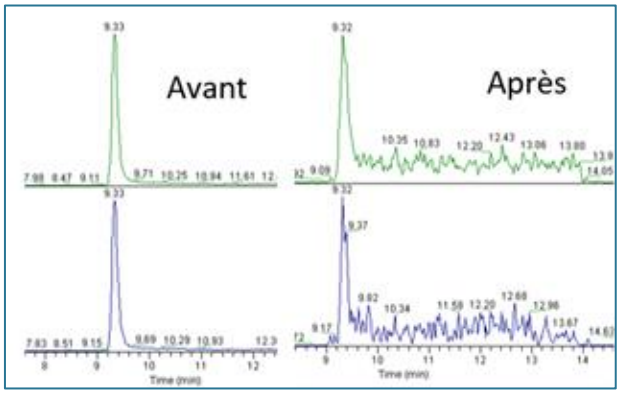


Figure 33 : Dégradation de la colonne Accucore Phenyl Hexyl pour le colorant MB

Le nouveau gradient défini est le suivant :

Tableau 16 : Gradient pour les conditions finales avec la colonne Sunfire (Waters)

Temps en minutes	**A''/B'**
0	70/30
2	5/95
10.1	5/95
11	70/30
21	70/30

De plus, une étude de comparaison sur la proportion d'acétate d'ammonium contenue dans la phase aqueuse a été réalisée (chromatogramme J, K, L). Les concentrations testées sont 5 mM, 10 mM et 20 mM en présence de phase organique « MeOH+ 0.1 % acide formique ». La proportion d'acétate d'ammonium n'a pas de réelle différence sur les pics des colorants analysés à l'exception des acides biliaires. Pour la suite de ce développement, la proportion choisie est 20 mM afin de faciliter les adduits ammonium. Un chromatogramme final est présenté en **annexe 3.**

Optimisation du solvant d'extraction

Le premier élément optimisé dans le protocole d'extraction est le solvant d'extraction afin d'évaluer sa capacité à extraire les molécules de la matrice (chair+ peau de poisson), notamment en faisant précipiter les protéines. Plusieurs conditions d'extractions ont été testées : solvants seuls (MeOH, ACN), mélanges de solvants pour faire varier la polarité (MeOH/hexane) ou l'acidité (solvant + acide ou tampon), et essai d'ajout d'hydroxylamine avant l'extraction pour faciliter l'extraction (**Figure 34)**. Chaque essai a été comparé avec un blanc afin de pouvoir calculer le rendement total de chaque colorant extrait de la matrice après l'ajout de la solution

de supplémentation en colorant et la solution de standard interne. Les résultats pour cette étape d'extraction se porteront ci-après sur l'AZB.

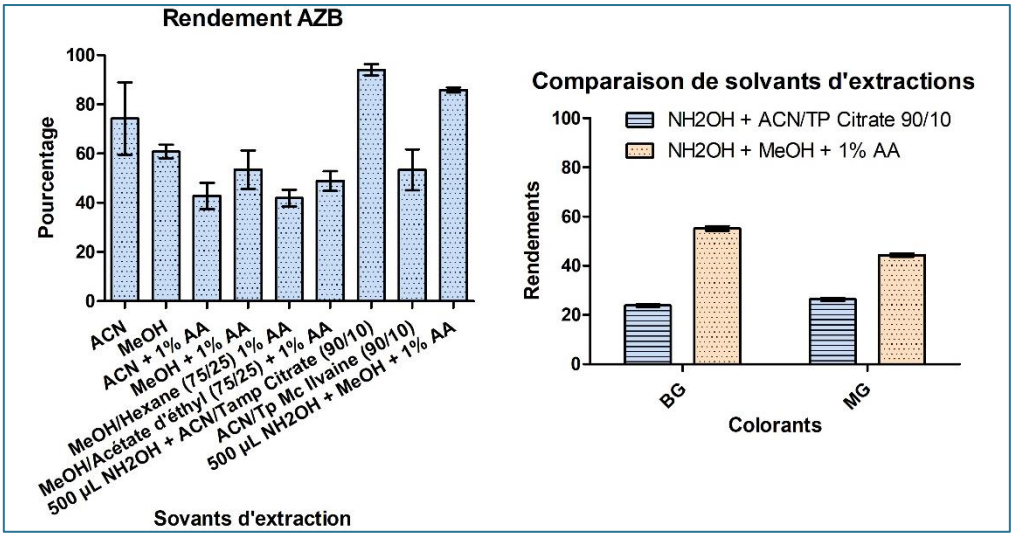


Figure 34 : Comparaison de solvants d'extractions

D'après la **Figure 34**, le rendement d'extraction varie suivant le type de solvants. En effet, l'ajout d'hydroxylamine suivit par l'extraction par un mélange de solvant de « ACN/Tampon Citrate 90:10 » paraissent des conditions favorables pour une extraction optimale de AZB. Cependant, au vu de tous nos colorant analysés, ce solvant n'a pas été retenu en raison de faible rendement pour BG et MG. Le solvant choisi pour la suite des manipulations est donc le « MeOH + 1 % en acide acétique » avec un ajout de 500 µL d'hydroxylamine au préalable.

Optimisation du solvant de reprise

Le solvant de reprise est un mélange de solvant utilisé afin de dissoudre le résidu à sec obtenu après évaporation à 50°C. Il sera ensuite filtré dans un filtre à 0.45µm et injecté dans la LC-MS/MS. Il doit donc être compatible avec la phase mobile et la solubilité des molécules. Pour cela, 4 solvants de reprise ont été testés afin de comparer les intensités des pics et leur forme. D'après le **Tableau 17,** le solvant de reprise choisi est donc « ACN/EAU 80:20 » en raison des intensités de pics supérieurs aux autres mais aussi pour une meilleure stabilité des molécules. Le tableau récapitulatif des intensités de pics est représenté en **annexe 4**.

Tableau 17 : Comparaison d'intensité de pics suivant le solvant de reprise

Solvants de reprise testés	ACN/EAU 80:20	ACN/Acide Ascorbique (100:1)	ACN/Phase A/Acide Ascorbique (70:25:5)	MeOH/Phase A/ Acide Ascorbique (70:25:5)
Intensité des pics	1,16E+06	2,50E+05	7,92E+05	7,04E+05

Mise en place d'une étape de purification

Lors du premier essai, un kit QuEchERS « $MgSO_4$ 4g /NaCl 1g » (référence : agilent technologies, Bond Elut - Original QuEchERS extract pouches) a été testé avec comme solvant d'extraction le « MeOH+1 % Acide Acétique ». Puis l'extractions avec le premier kit a été testé avec une purification complémentaire comprenant « $MgSO_4$ 1.5 g /C18 0.5 g » (référence : Interchim – Clean up Kit) mais en faisant varier le solvant d'extraction.

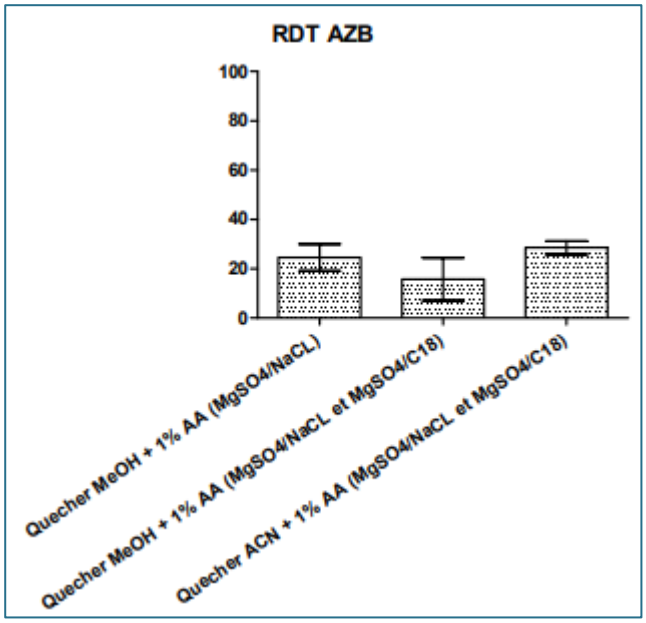
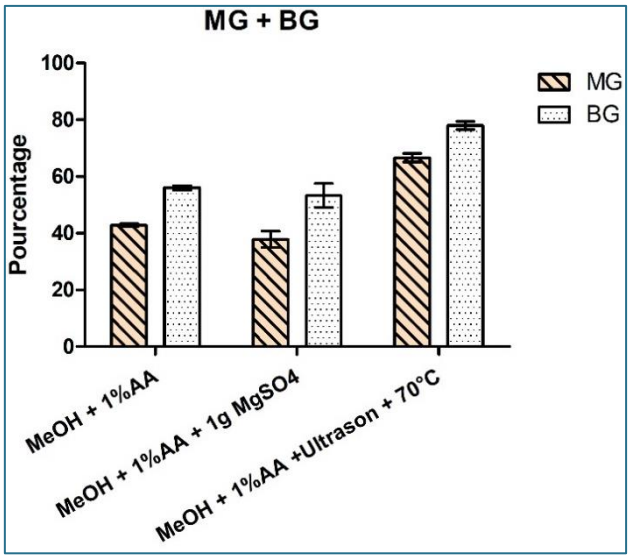


Figure 35 : Rendements d'extraction QuEchERS

Les résultats donnés en **Figure 35** montrent que l'utilisation de QuEchERS n'est pas très efficace concernant l'extraction des colorants (ici AZB) dans la chair de poisson. Les molécules restent probablement absorbées par les sels. L'étape de purification QuEchERS n'a donc pas donné suite pour l'optimisation de notre protocole d'extraction.

Amélioration de l'étape d'extraction

Après avoir déterminé les conditions d'extraction les plus appropriées, par « 500 µL d'hydroxylamine / MeOH + 1 % Acide Acétique », ainsi que le solvant de reprise par « ACN/EAU 80 :20 », des améliorations ont été mises en place afin d'obtenir de meilleurs rendements en particulier pour BG, LBG, MG, LMG, CV et LCV ainsi que pour les standards deutérés LMG-D_5 et MGD_5.



Après avoir réalisé des recherches bibliographiques, il est possible d'insérer une étape d'ultrason avec un chauffage à 70 °C.Les résultats ont montré qu'il est nécessaire d'avoir une étape de chauffage avec ultrason afin d'avoir de meilleurs rendements pour le vert de malachite (MG) et le vert brillant (BG) comme présenté en **Figure 36** mais aussi pour tous les autres colorants (Cf : **Annexe 6**). Le rendement moyen pour tous les colorants avec cette étape avoisine les 82 %.

Figure 36 : Amélioration du protocole d'extraction (exemple pour MG + BG)

Mise en place de la gamme d'étalonnage

Concernant la gamme d'étalonnage mise en place dans la matrice, certains niveaux de concentration ont dû être réévalués à la hausse (NBA- NMB – PRRA – AZB + 3 acides biliaires) en raison d'un manque de sensibilité du TSQ Quantum et d'une moins bonne sensibilité de ces molécules. Les niveaux de concentration adaptés pour l'analyse de colorants dans les poissons sont donnés en **annexe 5**.

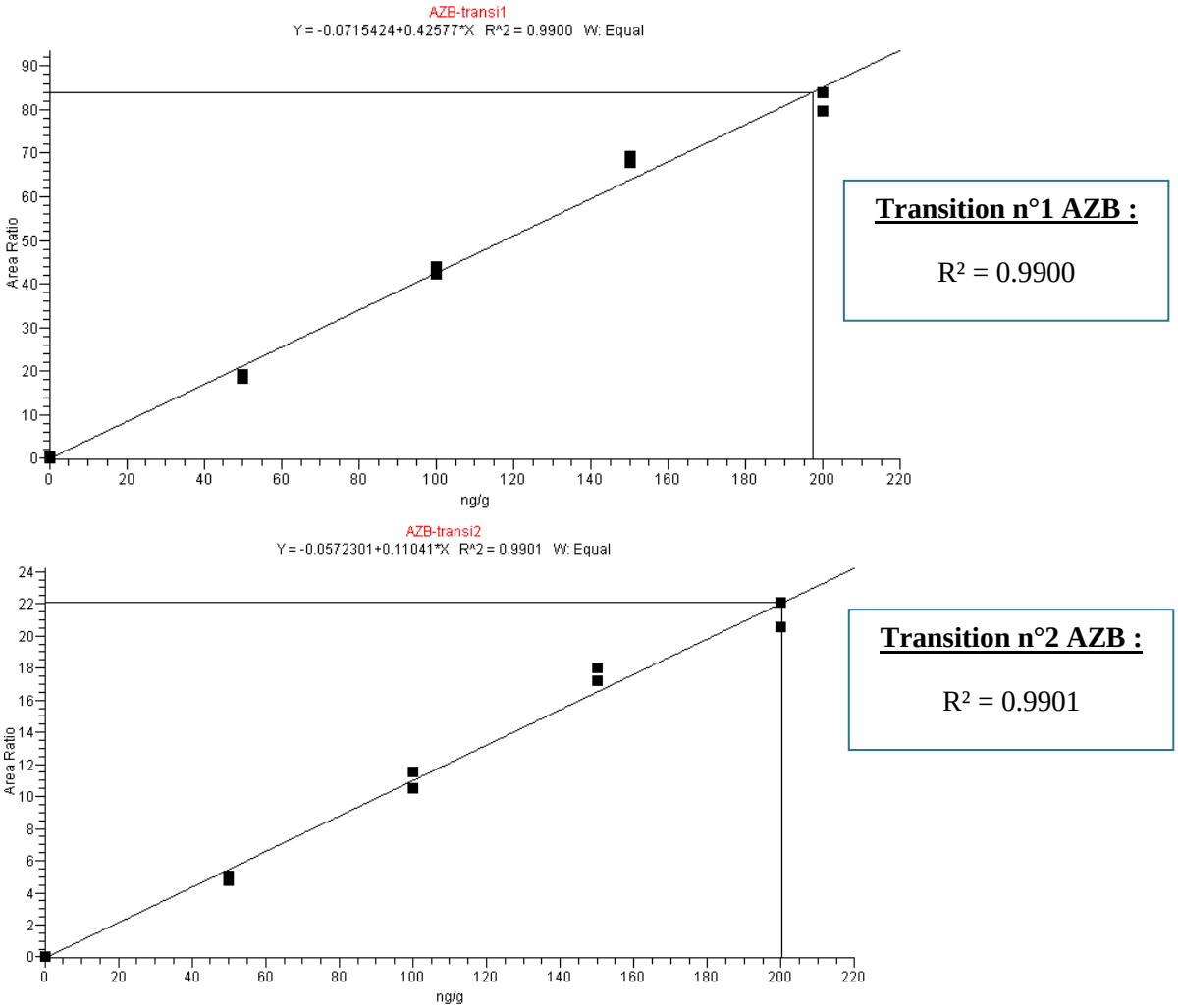


Figure 37 : Représentation des gammes d'étalonnage pour AZB

D'après ce que l'on peut constater, les essais de gammes pour la transition 1 et 2 du colorant AZB conduisent à des coefficients de détermination satisfaisants **(Figure 37)**.

En réalisant les essais de gamme, nous nous sommes rendus compte que les leuco-bases n'étaient pas très stables d'une injection à une autres. Il y a eu une modification du solvant de reprise en remplaçant « ACN/EAU 80:20 » par « ACN/EAU/Acide Ascorbique 1g/L 80:15:05 » afin d'améliorer la stabilité de ces dernières. En effet, l'acide ascorbique est un anti-oxydant, et ralentit l'oxydation spontanée de la forme réduite leuco en forme parent oxydée.

Le protocole final choisi pour ce développement de méthode (**Figure 38**) a permis d'obtenir des rendements d'extraction supérieurs à 70 % pour les colorants et supérieurs à 50 % pour les acides biliaires (Cf. **annexe 6**).

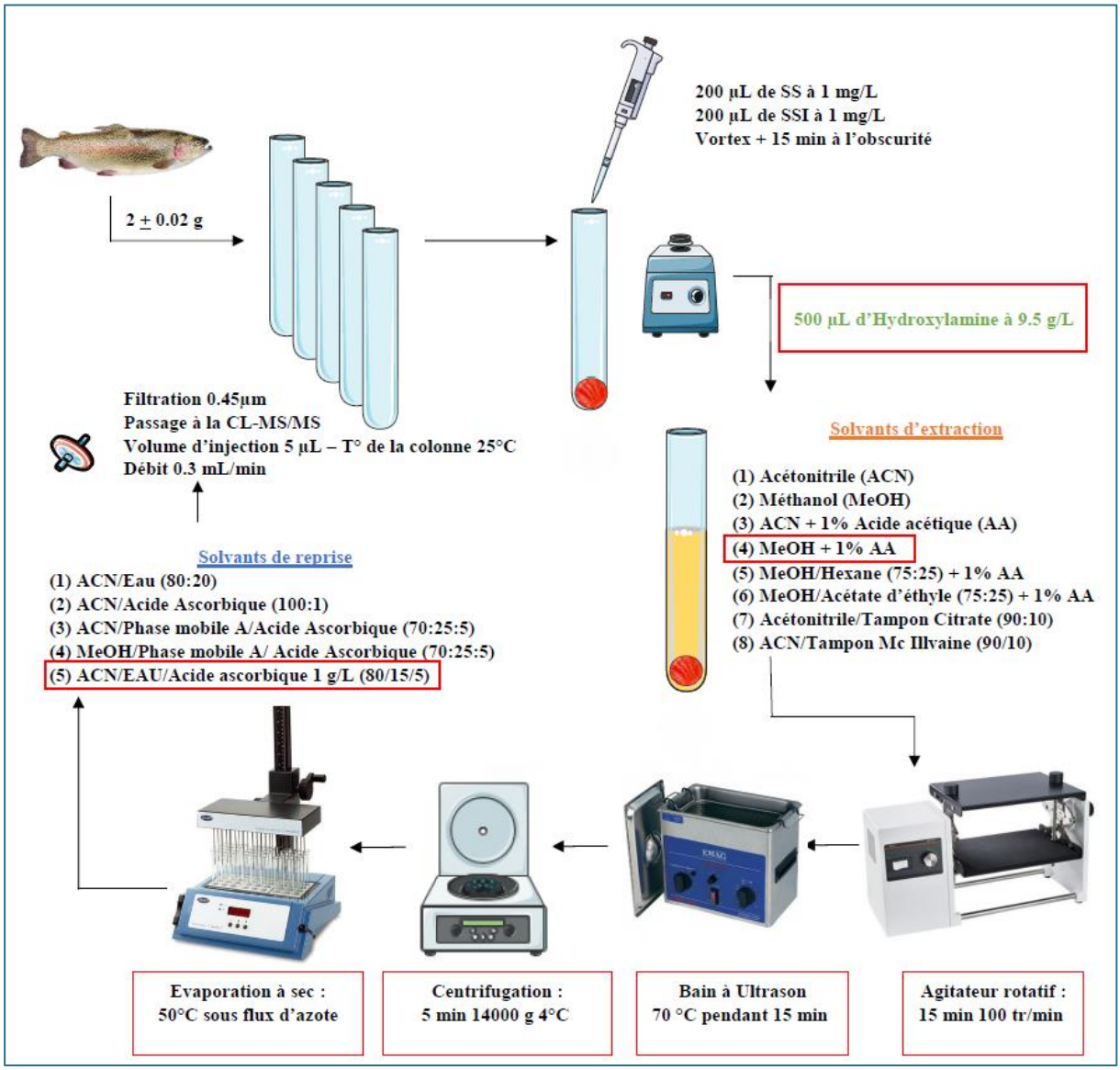


Figure 38 : Protocole d'extraction optimal des colorants et résidus marqueurs

Application de la méthode sur des échantillons terrain

L'objectif du stage était aussi de tester la méthode sur des échantillons terrain. Une étude d'occurrence restreinte a d'abord été réalisée, sur 18 poissons d'origines et d'espèces différentes **(Figure 39)**. Les résultats du dépistage se sont avérés négatifs.

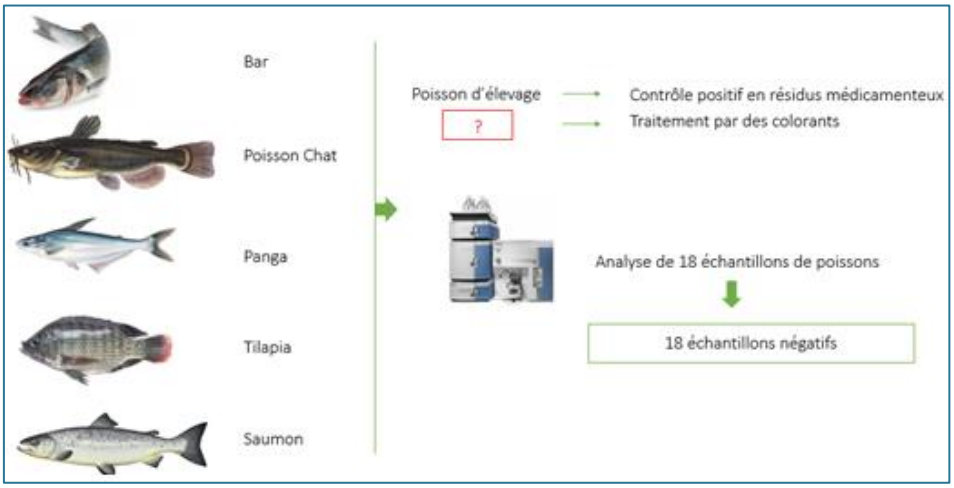


Figure 39 : Etude d'occurrence restreinte pour applicabilité de la méthode développée

Ainsi, nous avons cherché à obtenir des échantillons positifs en contactant les laboratoires agréés pour les analyses de colorants. Un échantillon de poissons chat a été confirmé en MG/LMG **(Figure 40)**. Les résultats ont été en accord avec ceux annoncés par le laboratoire de Vendée. De plus, nous avons pu constater une présence détectable de DCA et TRDA alors que ces acides biliaires n'étaient pas détectés dans le poisson chat témoin.

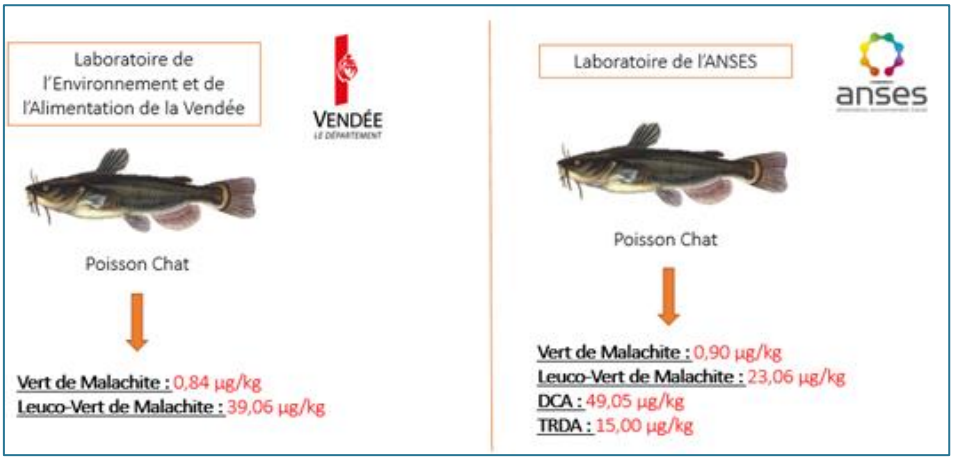


Figure 40 : Applicabilité de la méthode sur un échantillon positif en MG

1.4 Conclusion et perspective analytique

Si une méthode de confirmation des résidus de colorants par LC-MS/MS avec étape d'oxydation avait été développée et validée au début de notre projet, celle-ci avait néanmoins trouvé ses limites. En effet, l'oxydation peut s'avérer intéressante pour un nombre très restreint de composés, subissant la même réduction métabolique, comme MG et CV biotransformés en LMG et LCV. Mais un des problèmes avec les colorants réside en leur caractère électrostatique. Ils peuvent facilement contaminer des échantillons pendant les manipulations de préparation de

standards et d'échantillons et lors de l'analyse par LC-MSMS elle-même. La présence de métabolites et autres biomarqueurs extraits de l'échantillon apporte alors une information précieuse et une preuve formelle d'un traitement suspicieux.

C'est pourquoi le développement de cette nouvelle méthode apporte des perspectives intéressantes. Ce projet développé durant 3 mois a permis de mettre en place une méthode d'identification et de quantification de colorants susceptible d'être utilisés dans les bassins d'aquaculture. Il s'agit d'une méthode sensible pouvant atteindre des concentrations limites de 0.5 ppb pour certains colorants. Elle inclut les principaux colorants préoccupants (évalués par l'EFSA), mais aussi de nouveaux métabolites, le LBG (métabolite du BG) pouvant être quantifié grâce à la synthèse récente d'un standard analytique, et le DLVPBO suivi par ses transitions en dépistage (métabolite du VPBO). Les différents paramètres d'extractions ont été développés pour extraire au mieux les colorants présents dans le muscle de poissons.

Par la suite, cette méthode pourrait être validée sur un appareil de LC-MS/MS plus récent de type API 5500 afin de descendre encore en limites analytiques, si l'Union Européenne décide la mise en place de cette méthode en raison d'un risque sanitaire. Cet appareil permettrait de descendre plus bas en concentration pour AZB, PRRA, NBA et NMB. La méthode pourrait alors être validée sur trois jours dans plusieurs espèces de poissons et de crustacés. Il serait également intéressant de conserver les acides biliaires dans la méthode afin d'acquérir des données sur leurs perturbations lorsqu'un échantillon est positif en colorants, non seulement pour la truite, mais aussi pour d'autres espèces.

Pour avancer sur ce projet, il serait intéressant d'introduire des métabolites, s'avérant être des résidus marqueurs des autres colorants qui viendraient confirmer une métabolisation de colorants dans le foie, et donc qui prouveraient une présence de colorants en tant que traitement vétérinaire, ou aussi d'occurrence environnementale.

Partie IV : Discussion générale et perspectives

Les molécules interdites en élevage font l'objet d'une surveillance accrue, par des plans de contrôle de leurs résidus chimiques dans les denrées alimentaires et par des inspections des importations aux postes frontaliers. Les méthodes analytiques pour détecter et confirmer ces résidus doivent être adaptées aux échantillons prélevés et aux contaminants présents (médicaments, contaminants de l'environnement). Les résidus de colorants à usage thérapeutique aujourd'hui interdits en Union Européenne font ainsi l'objet d'un contrôle dans les denrées d'origine animale, principalement les produits d'aquaculture. L'objectif de cette thèse était d'explorer différentes approches analytiques permettant de proposer une évolution de la surveillance des mésusages de colorants en tant que molécules à activité pharmacologique.

En effet, les contrôles officiels ciblent à l'heure actuelle 3 colorants principaux (MG, CV, BG) et leurs métabolites (LMG, LCV, LBG). Malgré leur interdiction en élevage, ces colorants sont toujours utilisés comme l'indique ces 15 dernières années le système d'alerte européen (RASFF). D'autres molécules dérivées, comme le VPBO, sont probablement aussi testées de par le monde et présentes sur le terrain, pouvant engendrer également des problèmes de santé publique. De plus, l'évaluation des risques incite à regarder non seulement les dangers connus (on ne trouve que ce que l'on cherche), mais également rétrospectivement des dangers inconnus jusque-là, comme des métabolites plus toxiques, des adduits, des produits de dégradation…

Ainsi, le fil conducteur de cette thèse peut se résumer par la question clé suivante: **Quelle stratégie analytique adopter pour une surveillance sans faille dans le futur cadre réglementaire pour le cas des colorants interdits en traitement aquacole?** Autrement dit comment disposer d'une méthode évolutive et exhaustive, adaptée au réseau de contrôle national et européen. Le travail qui a été envisagé pour y répondre, et les résultats associés (**Tableau 18**), s'est déroulé en plusieurs étapes successives ou simultanées.

Tableau 18 : Principaux résultats des études réalisées, avantages et inconvénients associés

Approches	Résultats	Apports	Limites
Métabolomique non ciblée (phase animale-truite: 8 jours)	-Pas de marqueurs communs (VPBO≠MG) -2 métabolites endogènes identifiés (acides biliaires) -quelques métabolites exogènes déterminés	-Très peu de tri des signaux: « Full scan » -Marqueurs d'effets ⇒ Mise en évidence de nouveaux traitements	-Dépend des conditions d'extraction -Traitement des données -Annotation -Spécificité
Métabolisme *in vitro*	-16 métabolites de phase I, aucun de phase II -Principal métabolite identifié (dééthyl-VPBO)	-Etude rapide, peu coûteuse -Identification des principales réactions métaboliques	-Molécules parents spécifiques -Vérifier adéquation des résultats *in vitro* avec une étude animale restreinte
Métabolisme *in vivo*, pharmacocinétique (phase animale-truite :65 jours)	-14 métabolites de phase I et un de phase II. -principal métabolite identifié (leuco-dééthyl-VPBO) -demi-vies comparées	-Détermination fiable des résidus marqueurs sur une période de déplétion choisie en fonction du terrain	-Phase animale (utilisation d'animaux) -Etude plus longue/couteuse

⇨ Choix des molécules : les triarylméthanes (MG) et leurs dérivés (VPBO)

Le choix de ces familles pour réaliser la première étude de métabolomique nous est apparu assez logique. Nous souhaitions développer nos compétences dans ce domaine en les appliquant aux molécules dont nous sommes responsables en tant que laboratoire de référence. Les substances vétérinaires non autorisées que sont les colorants sont intéressantes pour cela. L'approche métabolomique non ciblée pour la découverte de résidus marqueurs identifiés par un effet biologique, avait déjà fait ses preuves avec par exemple la démonstration apportée sur traitement illicite de bovins par des promoteurs de croissance (Dervilly-Pinel et al., 2012). Pour notre étude, MG et VPBO étaient des modèles de molécules intéressantes pour les raisons évoquées dans ce manuscrit, l'une étant très connue en traitement aquacole et l'autre absolument pas. Ces deux molécules, représentatives de deux familles structuralement proches, présentent non seulement un intérêt de par leurs propriétés pharmacologiques, mais aussi du fait de leur occurrence dans l'environnement de par leur utilisation dans l'industrie notamment du textile. L'idée que tout est lié en matière de santé (le « One Health » concept) renforce l'idée de définir des résidus marqueurs pertinents, pour le contrôle alimentaire, et pour la contamination de l'environnement, même si ce n'est pas toujours aisément réalisable.

Ce choix s'est confirmé par une récente étude dans le cadre du programme « Tox21 » aux Etats-Unis. La toxicité de 10 000 substances chimiques a été étudiée au moyen de 70 tests cellulaires

différents couvrant plus de 200 voies de signalisation cellulaire, MG a été classé parmi les 30 médicaments les plus actifs. Le VPBO (basic blue 7) a été quant à lui déclaré l'un des composés les plus actifs parmi les contaminants de l'environnement (Ngan et al., 2019).

Perspective 1

Une des perspectives pour donner suite à cette étude serait de poursuivre la recherche de résidus marqueurs pour d'autres colorants, comme les autres Victoria blue (victoria blue B, victoria blue R), pour lesquels il n'y a actuellement pas de données directes disponibles pour engager une évaluation de risques.

⇨ Apport et limites de la métabolomique non ciblée en sécurité chimique des aliments

L'étude de métabolomique non ciblée réalisée au moyen de la LC-HRMS visait à rechercher chez le poisson des résidus marqueurs pouvant être corrélés à un traitement en aquaculture par un ensemble de colorants proches thérapeutiquement et structurellement. Des traitements illicites pourraient alors être facilement tracés et contrôlés grâce à l'effet biologique induit sur le métabolome des poissons si cet effet s'avérait être suffisamment spécifique. Nos résultats n'ont malheureusement pas mis en évidence une substance endogène commune aux deux traitements. Néanmoins, nous avons pu dégager un effet du MG ou du VPBO sur le métabolisme des acides biliaires. Le MG semble induire une sous-expression de l'acide tauroursodésoxycholique tandis que VPBO induirait une sur-expression d'acide glycodéoxycolique. Ces modifications du métabolisme cellulaire provoquées par ces 2 molécules n'ont pas pu donner lieu jusqu'à présent à une interprétation biologique de leur action. L'ultime but de ce genre d'étude serait de proposer un chemin métabolique complet et fiable dû au mode d'action des colorants (Labine and Simpson, 2020).

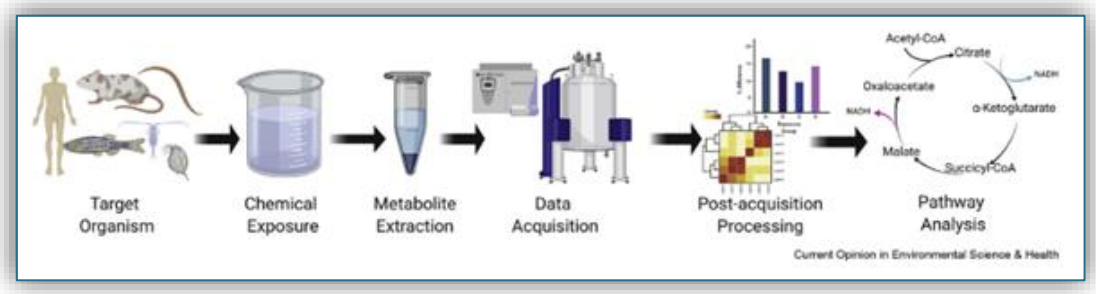


Figure 41 : Workflow conventionnel utilisé lors des expérimentations de métabolomique environnementale. Source : (Labine and Simpson, 2020)

Le métabolisme des acides biliaires semble bien être impacté, comme probablement celui d'autres substances endogènes, par des facteurs chimiques de contamination environnementale, comme l'a démontré une étude sur les modifications de métabolome des poissons (*Rutilus rutilus*) exposés à des effluents de traitements d'eaux usées (David et al., 2017).

Outre la génération de premières données de métabolisme chez la truite, l'approche de métabolomique non ciblée nous a permis de détecter et de confirmer la présence des métabolites directs de MG et de VPBO. L'intérêt d'une telle approche, vise aussi à maximiser la couverture des métabolites issus d'ensembles d'échantillons biologiques. Elle s'effectue sans à priori sur les types de signaux détectés donc elle offre la possibilité de capter aussi des signaux non suspectés, même si la grande majorité des caractéristiques métaboliques mesurées restent non identifiées (López-Ruiz et al., 2019). Cependant ce type d'approche dépend énormément des conditions expérimentales : animaux sélectionnés, organisation des prélèvements, conservation des échantillons, choix de l'extraction des molécules, de l'acquisition et du traitement du signal… Par exemple, nos chromatogrammes comportaient un bruit de fond important et la filtration des signaux pour des masses supérieures à 750 Da a été nécessaire. L'obtention de données biologiquement exploitables à partir des profils métaboliques issus d'analyses LC-HRMS en full scan reste donc limitée sur une gamme de masses moléculaires. De plus, l'analyse et la manipulation de ces données est très coûteuse en temps et reste encore trop souvent éloignée d'une interprétation biologique formelle. Enfin, de faibles signaux peuvent être écartés alors que pris dans un ensemble concomitant de faibles effets, ils pourraient être pertinents et révélateurs d'effets.

Perspective 2

Si une nouvelle étude de métabolomique était envisagée, il serait appréciable de compléter nos données par une approche de profilage, en ciblant cette fois-ci certaines voies métaboliques d'intérêt chez le poisson, donc avec à priori en adaptant la méthodologie appliquée. Il pourrait également s'avérer intéressant de mettre en œuvre des outils non létaux lors de l'expérimentation animale. Ces outils sont souvent utilisés pour la surveillance en temps réel des modifications métaboliques d'un organisme face à son environnement (Roszkowska et al., 2019).

⇨ Apports et limites de l'approche de métabolisme *in vitro*

La recherche de métabolites exogènes *in vitro* en utilisant des fractions subcellulaires de foie de truite a été fructueuse. De nombreux métabolites de phase I ont été décelés par LC-HRMS, non plus par approche globale mais par une approche semi-ciblée. Cette démarche a permis d'obtenir un tri rapide des principales voies de détoxification (déalkylation, oxydo-réduction, hydroxylation) et de mettre en évidence les réactions majeures. Elle a donc l'avantage d'être rapide, peu couteuse, et relativement facile à maitriser dès lors que les fractions subcellulaires sont disponibles. Dans ce projet, nous nous sommes intéressés à la fabrication de ces fractions, assez délicates à préparer, nécessitant un savoir-faire afin de conserver les enzymes en bon état de fonctionnalité. La biotransformation de VPBO a d'ailleurs été démontrée comme étant dépendante des enzymes CYP450, comme dans le cas de MG. Le métabolite N-dééthylé de VPBO a été détecté avec la plus forte intensité de pic chromatographique lors des incubations réalisées avec les microsomes et les fractions S9. Cependant, la comparaison des métabolites obtenus *in vitro* avec ceux exprimés dans le métabolisme *in vivo* a montré que la simple dééthylation était bien majeure dans les deux études, mais que la réduction de la double liaison centrale pour obtenir la leuco forme était quasiment absente *in vitro*. Même si le CYP1A2 joue un rôle dans cette réaction, cette voie n'est certainement pas la seule en jeu. Il conviendrait à l'avenir de déterminer le chemin métabolique (« metabolic pathway »), permettant de caractériser la séqence des évênements enzymatiques.

Cette approche *in vitro* présente donc quelques inconvénients pour la recherche de résidus marqueurs, car elle est fortement dépendante des conditions expérimentales et de cette séquence *in vivo*. Néanmoins elle peut s'avérer intéressante en première intention (« screening métabolique ») pour comparer les métabolites issus de différentes espèces d'intérêt en sécurité des aliments, sans passer par une phase animale à mettre en œuvre pour chaque espèce (ex : corrélation *in vitro* multiples espèces dont espèces mineures avec simplement une ou deux espèces *in vivo*). Par ailleurs, les fractions hépatiques microsomales et S9 manquent d'un certain nombre de caractéristiques physiologiques importantes pour les processus métaboliques. Ces systèmes subcellulaires ne représentent pas les caractéristiques *in vivo* aussi précisément que des hépatocytes en culture par exemple. De plus, les fractions microsomales sont limitées par l'absence de cofacteurs pour les enzymes de phase II, même si ces derniers peuvent être ajoutés pendant les incubations. L'activité de ces fractions est aussi de courte durée dans les incubations. Les mesures

d'exposition chronique *in vivo*, réalisées sur deux mois dans ce projet, ne sont donc pas réalisables avec ces fractions, c'est pourquoi nous avons jugé nécessaire de compléter cette approche avec une expérimentation animale.

Perspective 3

Aussi, afin de combler les lacunes des fractions subcellulaires, une des possibilités envisagées lors d'une prochaine étude de métabolisme serait d'utiliser des hépatocytes primaires de truites. Ce modèle serait une bonne alternative, car c'est un système plus intégratif plus proche de ce qui se passe *in vivo*, comprenant des paramètres métaboliques supplémentaires comme les transporteurs membranaires. Une autre alternative serait de tester les modèles 3D. La culture de sphéroïdes est encore peu utilisée pour l'étude du métabolisme des xénobiotiques chez la truite. Ils permettent de surmonter la perte de viabilité des cellules maintenues en suspension, en améliorant le maintien de la différenciation dans les hépatocytes. Ces modèles, encore en développement chez l'humain, sont des outils utiles pour déterminer le potentiel de bioaccumulation des contaminants environnementaux, par exemple pour caractériser leur devenir métabolique et les dangers potentiels de leurs métabolites.

L'architecture des sphéroïdes est physiologiquement plus pertinente et fournit une intégrité fonctionnelle élevée par rapport au métabolisme et à l'efflux des xénobiotiques. Le système présenterait également l'avantage de permettre l'étude de l'excrétion biliaire (Uchea et al., 2013; Uchea et al., 2015).

⇨ Apports et limites de la pharmacocinétique

Une nouvelle étude *in vivo*, représentant une phase animale de 65 jours, a été réalisée chez la truite traitée au VPBO afin d'obtenir le panel complet de métabolites *in vivo* et en les rapprochant de ceux déterminés *in vitro*. Les résultats ont permis d'identifier 14 métabolites de phase I et un métabolite de phase II, probablement le parent conjugué au glucuronide. Le métabolite détecté principalement pendant les périodes de traitement et de déplétion, le dééthyl-leuco-VPBO (DLVPBO), a été identifié. Comme annoncé précédemment, il ne s'agissait donc pas du dééthyl-VPBO identifié comme majeur pendant l'étude *in vitro*.

Cependant celui-ci a également été détecté fortement *in vivo*. La déplétion du principal métabolite DLVPBO dans le temps et dans différents tissus biologiques de truite a été comparée à celle du VPBO. Une analyse non-compartimentale a été appliquée afin de décrire les principaux paramètres pharmacocinétiques (demi-vies, clairances..). À 60 jours de dépuration, les concentrations de VPBO dans les muscles et la peau (moyenne de 2,5 $\mu g.kg^{-1}$) ont été mesurées légèrement supérieures à la limite de quantification de notre méthode (0,5 $\mu g.kg^{-1}$), tandis que les concentrations du métabolite DLVPBO se sont avérées être en moyenne de 8,8 $\mu g.kg^{-1}$ dans les mêmes tissus. Nos résultats nous ont permis de conclure que pour un contrôle efficace des résidus du traitement, le VPBO et son principal métabolite DLVPBO, un marqueur de résidus approprié, doivent tous deux être surveillés sans dissocier la chair de la peau adhérente.

La difficulté de ces expérimentations animales réside dans le choix de la dose d'exposition, puisqu'il s'agit de produits interdits et que de ce fait nous n'avions aucune référence sur les données de contaminations ni sur les données de traitements. Le respect de l'éthique en expérimentation animale était également à considérer. La dose d'exposition retenue semble avoir été adéquate, permettant d'obtenir suffisamment de résultats de métabolisation tout en maintenant les poissons dans des conditions physiologiques d'élevage. Une étude complète de résidus *in vivo* représente l'aboutissement dans la détermination fiable de résidus marqueurs pour une molécule donnée, mais elle ne peut s'appliquer qu'à une seule molécule à la fois. La période de cinétique de déplétion peut également être adaptée en fonction de la réalité terrain, ici notamment la durée d'élevage piscicole avant commercialisation. Un modèle PBPK, avec des données d'entrée appropriées, permet alors de simuler les comportements des molécules à plus long terme et de réduire ainsi la durée d'expérimentation. Une extrapolation de dose unique vers une exposition chronique est simulée, avec ce modèle, grâce au principe de conservation des paramètres pharmacocinétiques (ex : biodisponibilité, clairances). Notre modèle a permis de décrire les données étendues à une durée de deux mois et pour l'espèce truite arc-en-ciel.

Perspective 4

Ainsi, il pourrait être envisagé de compléter notre étude de résidus *in vivo* afin d'accumuler des connaissances pour d'autres espèces aquacoles et de confirmer si les résidus marqueurs seraient les mêmes que ceux obtenus chez la truite. Dans une première étape, il serait intéressant de tester un modèle PBTK générique développé et adapté pour la truite arc-en-ciel (*Onchorhynchus mykiss*), et pour trois autres espèces dont la physiologie est déjà renseignée pour l'éco-toxicologie (*Danio rerio (poisson zèbre*), *Pimephales promelas (tête de boule)* et *Gasterosteus aculeatus (épinoche)* (Grech et al., 2019) afin de comparer les valeurs prédictives du modèle à nos données terrain pour le VPBO et si possible le DLVPBO. Dans une deuxième étape, il pourrait être envisagé d'appliquer le modèle pour une autre espèce si les paramètres physiologiques de l'espèce sont disponibles, ce qui limiterait le besoin d'expérimentations animales supplémentaires. Enfin, une extrapolation du modèle pour un autre composé, le victoria blue R par exemple, serait réalisable en utilisant une approche IVIVE. L'extrapolation *in vitro* à *in vivo* (IVIVE) couplée à une modélisation PBPK consiste à rapprocher quantitativement les données *in vitro* obtenues pour la molécule d'intérêt et *in vivo* afin d'explorer les mécanismes clés dictant la pharmacocinétique (Yoon and Clewell, 2016; Fairman et al., 2020). Dans le modèle, les paramètres spécifiques au composé étudié peuvent être déterminés soit par des mesures *in vivo*, soit des essais *in vitro* (IVIVE) soit *in silico* par des outils de type QSAR.

⇨ Evolution des méthodes de contrôle des colorants

L'évolution des méthodes de contrôle des colorants dans les produits d'aquaculture devra être envisagée dans un futur proche afin de répondre à une surveillance accrue face à un risque très probable de sécurité sanitaire. Pour anticiper ces évolutions réglementaires, nous avons exploré différentes méthodologies de travail. Les recherches et développements de méthodes analytiques se sont axées sur l'augmentation du nombre de colorants probables en aquaculture d'une part, et sur la détermination de leurs résidus marqueurs endogènes ou exogènes d'autre part. Notre démarche initiale (en étude pré-thèse) a permis de mettre au point et de valider une

méthode de confirmation incluant une étape d'oxydation capable de quantifier les composés parents de 14 colorants. Cette méthode permettait de faire abstraction de l'analyse des métabolites présents sous formes de leuco-bases. Cependant comme discuté dans cette thèse, elle montre quelques points faibles à ne pas négliger. Elle reste néanmoins intéressante de par la sensibilité atteinte (autour du µg/kg) et de par sa facilité de mise en œuvre. Le travail de thèse à proprement parler a consisté en la recherche de résidus marqueurs appropriés, pouvant être inclus dans une méthode analytique plus générale. Le travail s'est concentré méthodologiquement sur le VPBO, et les résultats escomptés ont été assez nombreux. Nous avons identifié des métabolites directs du VPBO, dont un résidu marqueur (le DLVPBO) par les deux approches *in vitro* et *in vivo*. Comme évoqué ci-dessus en perspectives 1, 3, 4, la qualification de résidus marqueurs pourra être complétée pour d'autres espèces de poissons, d'autres colorants et par des combinaisons d'approches *in vitro, in vivo, voire in silico*. Nous avons également mis en évidence, lors d'une étude de métabolomique non ciblée, un métabolisme des acides biliaires affecté chez la truite traitée par les deux colorants étudiés. Ces métabolites biochimiques endogènes identifiés comme résidus marqueurs d'effets, ne montrent toutefois pas encore suffisamment de spécificité pour être directement retenus dans une optique de contrôle. Comme discuté en perspective 2, il serait indispensable de déterminer les autres voies métaboliques affectées lors d'un traitement par des colorants chez le poisson, notamment par une étude de profilage.

De cet ensemble de données a ensuite émergé le développement d'une nouvelle méthode analytique, incluant 13 colorants, et 5 de leurs métabolites dont ceux du VPBO, ainsi que 3 acides biliaires. Cette méthode devrait être un outil appréciable pour d'une part orienter le futur besoin réglementaire pour le contrôle de substances vétérinaires interdites en aquaculture et d'autre part pour contribuer à l'évaluation du risque alimentaire par la prise en compte de plusieurs mesures d'exposition. Le futur de la sécurité des aliments évolue depuis quelques années vers une approche intégrée. Les consommateurs sont constamment exposés à des traces de résidus présents dans les denrées alimentaires, résultant de l'utilisation de médicaments vétérinaires et de pesticides (Czaja et al., 2020). Pour cette raison, l'évaluation du risque causé par les résidus de contaminants présents dans les aliments nécessite non seulement l'identification et l'évaluation des propriétés toxicologiques de la substance active, mais également de ses métabolites, isomères et dégradations, afin d'estimer la contribution de chaque métabolite à la charge toxicologique subie par les consommateurs.

Bibliographie

~A~

Agreste, 2018. Enquête Aquaculture 2018. in: l'alimentation, M.d.l.a.e.d. (Ed.). La statistique, l'évaluation et la prospective agricole.
Albert, A., 1958. Chemical aspects of selective toxicity. Nature 182, 421-423.
Alderman, D.J., 1982. In vitro testing of fisheries chemotherapeutants. Journal of Fish Diseases 5, 113-123.
Alderman, D.J., 1985. Malachite green: a review. Journal of Fish Diseases 8, 289-298.
Alderman, D.J., Clifton-Hadley, R.S., 1993. Malachite green: a pharmacokinetic study in rainbow trout, Oncorhynchus mykiss (Walbaum). Journal of Fish Diseases 16, 297-311.
Allen, J.L., Gofus, J.E., Meinertz, J.R., 1994. Determination of malachite green residues in the eggs, fry, and adult muscle tissue of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Journal of AOAC International 77, 553-557.
Amelin, V.G., Korotkov, A.I., Andoralov, A.M., 2017. Simultaneous determination of dyes of different classes in aquaculture products and spices using HPLC–high-resolution quadrupole time-of-flight mass spectrometry. Journal of Analytical Chemistry 72, 183-190.
Andersen, W.C., Casey, C.R., Schneider, M.J., Turnipseed, S.B., 2015. Expansion of the scope of AOAC first action method 2012.25 - Single-laboratory validation of triphenylmethane dye and leuco metabolite analysis in shrimp, tilapia, catfish, and salmon by LC-MS/MS. Journal of AOAC International 98, 636-648.
Andersen, W.C., Roybal, J.E., Turnipseed, S.B., 2005. Liquid chromatographic determination of malachite green and leucomalachite green (LMG) residues in salmon with in situ LMG oxidation. Journal of AOAC International 88, 1292-1298.
Andersen, W.C., Turnipseed, S.B., Karbiwnyk, C.M., Lee, R.H., Clark, S.B., Rowe, W.D., Madson, M.R., Miller, K.E., 2009a. Multiresidue method for the triphenylmethane dyes in fish: Malachite green, crystal (gentian) violet, and brilliant green. Anal Chim Acta 637, 279-289.
Andersen, W.C., Turnipseed, S.B., Karbiwnyk, C.M., Lee, R.H., Clark, S.B., Rowe, W.D., Madson, M.R., Miller, K.E., 2009b. Multiresidue method for the triphenylmethane dyes in fish: Malachite green, crystal (gentian) violet, and brilliant green. Analytica Chimica Acta 637, 279-289.
Andersen, W.C., Turnipseed, S.B., Roybal, J.E., 2006. Quantitative and confirmatory analyses of malachite green and leucomalachite green residues in fish and shrimp. Journal of Agricultural and Food Chemistry 54, 4517-4523.
Anderson, H.H., Emerson, G.A., Fisher, B.H., 1934. Acute Toxicity of Trypan Blue, Gentian Violet and Brilliant Green. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 31, 825-828.
Antonelli, J., Claggett, B.L., Henglin, M., Kim, A., Ovsak, G., Kim, N., Deng, K., Rao, K., Tyagi, O., Watrous, J.D., Lagerborg, K.A., Hushcha, P.V., Demler, O.V., Mora, S., Niiranen, T.J., Pereira, A.C., Jain, M., Cheng, S., 2019. Statistical workflow for feature selection in human metabolomics data. Metabolites 9.
Arroyo, D., Ortiz, M.C., Sarabia, L.A., Palacios, F., 2009. Determination and identification, according to European Union Decision 2002/657/EC, of malachite green and its metabolite in fish by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using an optimized extraction procedure and three-way calibration. Journal of Chromatography A 1216, 5472-5482.
Ascari, J., Dracz, S., Santos, F.A., Lima, J.A., Diniz, M.H., Vargas, E.A., 2012. Validation of an LC-MS/MS method for malachite green (MG), leucomalachite green (LMG), crystal violet (CV) and leucocrystal violet (LCV) residues in fish and shrimp. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess 29, 602-608.
Assefa, A., Abunna, F., 2018. Maintenance of Fish Health in Aquaculture: Review of Epidemiological Approaches for Prevention and Control of Infectious Disease of Fish. Veterinary Medicine International 2018.

~B~

Bajc, Z., Jenčič, V., Šinigoj Gačnik, K., 2011. Elimination of malachite green residues from meat of rainbow trout and carp after water-born exposure. Aquaculture 321, 13-16.
Barani, A., Tajik, H., 2017. Malachite green residue in farmed fish in north-west part of Iran. International Journal of Food Properties 20, S580-S585.
Barrett, J.H., 2019. An environmental (pre)history of European fishing: past and future archaeological contributions to sustainable fisheries. Journal of Fish Biology 94, 1033-1044.
Belpaire, C., Reyns, T., Geeraerts, C., Van Loco, J., 2015. Toxic textile dyes accumulate in wild European eel Anguilla anguilla. Chemosphere 138, 784-791.
Bergwerff, A.A., Scherpenisse, P., 2003. Determination of residues of malachite green in aquatic animals. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences 788, 351-359.
Bermejo-Nogales, A., Fernández-Cruz, M.L., Navas, J.M., 2017. Fish cell lines as a tool for the ecotoxicity assessment and ranking of engineered nanomaterials. Regulatory Toxicology and Pharmacology 90, 297-307.
Bilandžić, N., Varenina, I., Kolanović, B.S., Oraić, D., Zrnčić, S., 2012. Malachite green residues in farmed fish in Croatia. Food Control 26, 393-396.
Bilodeau, A.L., Small, B.C., Wise, D.J., Wolters, W.R., 2005. Pathogen levels, lysozyme, and cortisol response in channel catfish with susceptibility differences to Edwardsiella ictaluri. Journal of Aquatic Animal Health 17, 138-146.
Brock, N., Erhardt, A., 1951. [Pharmacotherapy of oxyuriasis. I. Pharmacologic, toxicologic and chemotherapeutic studies with pararosaniline dyes and their carbinol bases]. Arzneimittel-Forschung 1, 5-21.
Bumpus, J.A., Brock, B.J., 1988. Biodegradation of crystal violet by the white rot fungus Phanerochaete chrysosporium. Applied and environmental microbiology 54, 1143-1150.
Burkina, V., Sakalli, S., Pilipenko, N., Zlabek, V., Zamaratskaia, G., 2018a. Effect of human pharmaceuticals common to aquatic environments on hepatic CYP1A and CYP3A-like activities in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss): An in vitro study. Chemosphere 205, 380-386.
Burkina, V., Sakalli, S., Zlabek, V., Zamaratskaia, G., 2018b. CYP1A1 activity in rainbow trout is inhibited by the environmental pollutant p-cresol. Environmental Toxicology and Pharmacology 62, 199-202.
Burridge, L., Weis, J.S., Cabello, F., Pizarro, J., Bostick, K., 2010. Chemical use in salmon aquaculture: A review of current practices and possible environmental effects. Aquaculture 306, 7-23.

~C~

Campbell, R.E., Lilley, J.H., Taukhid, Panyawachira, V., Kanchanakhan, S., 2001. In vitro screening of novel treatments for Aphanomyces invadans. Aquaculture Research 32, 223-233.
Cappello, T., Giannetto, A., Parrino, V., De Marco, G., Mauceri, A., Maisano, M., 2018. Food safety using NMR-based metabolomics: Assessment of the Atlantic bluefin tuna, Thunnus thynnus, from the Mediterranean Sea. Food and Chemical Toxicology 115, 391-397.
Castillo, S., Gopalacharyulu, P., Yetukuri, L., Orešič, M., 2011. Algorithms and tools for the preprocessing of LC-MS metabolomics data. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems 108, 23-32.
Cesbron, N., Royer, A.L., Guitton, Y., Sydor, A., Le Bizec, B., Dervilly-Pinel, G., 2017. Optimization of fecal sample preparation for untargeted LC-HRMS based metabolomics. Metabolomics 13.
Cha, C.J., Doerge, D.R., Cerniglia, C.E., 2001. Biotransformation of Malachite Green by the Fungus Cunninghamella elegans. Applied and Environmental Microbiology 67, 4358-4360.
Chaleckis, R., Meister, I., Zhang, P., Wheelock, C.E., 2019. Challenges, progress and promises of metabolite annotation for LC–MS-based metabolomics. Current Opinion in Biotechnology 55, 44-50.
Chan, D., Tarbin, J.A., Stubbings, G., Kay, J., Sharman, M., 2012. Analysis of incurred crystal violet in atlantic salmon (Salmo salar L.): Comparison between the analysis of crystal violet as an individual parent and leucocrystal violet and as total crystal violet after oxidation with 2,3-dichloro-5,6-

dicyanobenzoquinone. Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment 29, 66-72.
Chang, G.R., Chen, H.S., Lin, F.Y., 2016. Analysis of banned veterinary drugs and herbicide residues in shellfish by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) and gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC/MS/MS). Marine Pollution Bulletin 113, 579-584.
Chen, D., Delmas, J.M., Hurtaud-Pessel, D., Verdon, E., 2020. Development of a multi-class method to determine nitroimidazoles, nitrofurans, pharmacologically active dyes and chloramphenicol in aquaculture products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Food Chemistry 311.
Chen, G., Miao, S., 2010. HPLC determination and MS confirmation of malachite green, gentian violet, and their leuco metabolite residues in channel catfish muscle. Journal of Agricultural and Food Chemistry 58, 7109-7114.
Chen, J., Wei, Z., Cao, X.Y., 2019. QuEChERS Pretreatment Combined with Ultra-performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry for the Determination of Four Veterinary Drug Residues in Marine Products. Food Analytical Methods.
Churchman, J.W., Herz, L.F., 1913. The toxicity of gentian violet and its fate in the animal body. Journal of Experimental Medicine 18, 579-583.
Cleinmensen, S., Jensen, J.C., Jensen, N.J., Meyer, O., Olsen, P., Würtzen, G., 1984. Toxicological studies on malachite green: A triphenylmethane dye. Archives of Toxicology 56, 43-45.
Clifton-Hadley, R.S., Alderman, D.J., 1987. The effects of malachite green upon proliferative kidney disease. Journal of Fish Diseases 10, 101-107.
Commission Européenne, E., 2002a. 2002/657/CE: Décision de la Commission Européenne du 12 août 2002 portant modalités d'application de la directive 96/23/CE du Conseil en ce qui concerne les performances des méthodes d'analyse et l'interprétation des résultats in: OJ (Ed.). L 221, pp. 8–36.
Commission Européenne, E., 2004. 2004/25/CE: Décision de la Commission Européenne du 22 décembre 2003 modifiant la décision 2002/657/CE en ce qui concerne la fixation de limites de performances minimales requises (LPMR) pour certains résidus dans les aliments d'origine animale. in: OJ (Ed.). L 6, pp. 38-39.
Commission Européenne, E., 2005. 2005/34/CE: Décision de la Commission Européenne du 11 janvier 2005 établissant des normes harmonisées pour les tests de détection de certains résidus dans les produits d'origine animale importés des pays tiers in: OJ (Ed.). L 16, pp. 61-63.
Commission Européenne, E., 1996. Directive 96/23/CE du Conseil, du 29 avril 1996, relative aux mesures de contrôle à mettre en oeuvre à l'égard de certaines substances et de leurs résidus dans les animaux vivants et leurs produits in: OJ (Ed.). L 125, pp. 10-32.
Commission Européenne, E., 2020. EU import conditions for seafood and other fishery products. https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/ia_trade_import-cond-fish_en.pdf.
Commission Européenne, E., RASFF portal. https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/.
Commission Européenne, E., 2009. Règlement (CE) no 470/2009 du Parlement européen et du Conseil du 6 mai 2009 établissant des procédures communautaires pour la fixation des limites de résidus des substances pharmacologiquement actives dans les aliments d'origine animale. in: OJ (Ed.). L 152, pp. 11-22.
Commission Européenne, E., 2008. Règlement (CE) No 1272/2008 du parlement européen et du conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) no 1907/2006. in: JO (Ed.). L 353, p. 1.
Commission Européenne, E., 2017. Règlement (UE) 2017/625 du Parlement européen et du Conseil du 15 mars 2017 concernant les contrôles officiels et les autres activités officielles servant à assurer le respect de la législation alimentaire et de la législation relative aux aliments pour animaux ainsi que des règles relatives à la santé et au bien-être des animaux, à la santé des végétaux et aux produits phytopharmaceutiques. in: OJ (Ed.). L 95, pp. 1-142.
Commission Européenne, E., 2019. Règlement (UE) 2019/1871 de la Commission Européenne du 7 novembre 2019 relatif aux valeurs de référence pour les substances pharmacologiquement actives non autorisées présentes dans les denrées alimentaires d'origine animale et abrogeant la Décision 2005/34/CE in: OJ (Ed.). L 289, pp. 41-46.
Commission Européenne, E., 2010. Règlement (UE) no 37/2010 de la Commission Européenne du 22 décembre 2009 relatif aux substances pharmacologiquement actives et à leur classification en ce qui

concerne les limites maximales de résidus dans les aliments d'origine animale. in: OJ (Ed.). L 15, pp. 1-72.
Commission Européenne, E., 2002b. Regulation (EC) No 178/2002 of the European Parliament and of the Council of 28 January 2002 laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food safety. in: OJ (Ed.). L 31, pp. 1-24.
Commission Européenne, E., 2016-2018. Reports on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products. https://www.efsa.europa.eu/fr/publications?page=1&f%5B0%5D=im_field_subject%3A61826.
Connors, K.A., Du, B., Fitzsimmons, P.N., Hoffman, A.D., Chambliss, C.K., Nichols, J.W., Brooks, B.W., 2013. Comparative pharmaceutical metabolism by rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) liver S9 fractions. Environmental Toxicology and Chemistry 32, 1810-1818.
Culp, S.J., 2004. NTP technical report on the toxicity studies of malachite green chloride and leucomalachite green (CAS Nos. 569-64-2 and 129-73-7) administered in feed to F344/N rats and B6C3F1 mice. Toxicity report series, 1-F10.
Culp, S.J., Blankenship, L.R., Kusewitt, D.F., Doerge, D.R., Mulligan, L.T., Beland, F.A., 1999. Toxicity and metabolism of malachite green and leucomalachite green during short-term feeding to Fischer 344 rats and B6C3F1 mice. Chemico-Biological Interactions 122, 153-170.
Culp, S.J., Mellick, P.W., Trotter, R.W., Greenlees, K.J., Kodell, R.L., Beland, F.A., 2006. Carcinogenicity of malachite green chloride and leucomalachite green in B6C3F<inf>1</inf> mice and F344 rats. Food and Chemical Toxicology 44, 1204-1212.
Czaja, K., Struciński, P., Korcz, W., Minorczyk, M., Hernik, A., Wiadrowska, B., 2020. Alternative toxicological methods for establishing residue definitions applied for dietary risk assessment of pesticides in the European Union. Food and Chemical Toxicology 137.

~D~

Danion, M., Le Floch, S., Kanan, R., Lamour, F., Quentel, C., 2012. Effects of in vivo chronic exposure to pendimethalin/Prowl 400® on sanitary status and the immune system in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Science of the Total Environment 424, 143-152.
David, A., Lange, A., Abdul-Sada, A., Tyler, C.R., Hill, E.M., 2017. Disruption of the Prostaglandin Metabolome and Characterization of the Pharmaceutical Exposome in Fish Exposed to Wastewater Treatment Works Effluent As Revealed by Nanoflow-Nanospray Mass Spectrometry-Based Metabolomics. Environmental Science and Technology 51, 616-624.
Debnam, P., Glanville, S., Clark, A.G., 1993. Inhibition of glutathione s-transferases from rat liver by basic triphenylmethane dyes. Biochemical Pharmacology 45, 1227-1233.
Dervilly-Pinel, G., Chereau, S., Cesbron, N., Monteau, F., Le Bizec, B., 2015. LC-HRMS based metabolomics screening model to detect various β-agonists treatments in bovines. Metabolomics 11, 403-411.
Dervilly-Pinel, G., Courant, F., Chéreau, S., Royer, A.L., Boyard-Kieken, F., Antignac, J.P., Monteau, F., Le Bizec, B., 2012. Metabolomics in food analysis: Application to the control of forbidden substances. Drug Testing and Analysis 4, 59-69.
Dervilly-Pinel, G., Weigel, S., Lommen, A., Chereau, S., Rambaud, L., Essers, M., Antignac, J.P., Nielen, M.W.F., Le Bizec, B., 2011. Assessment of two complementary liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry metabolomics strategies for the screening of anabolic steroid treatment in calves. Analytica Chimica Acta 700, 144-154.
Doerge, D.R., Churchwell, M.I., Gehring, T.A., Pu, Y.M., Plakas, S.M., 1998. Analysis of malachite green and metabolites in fish using liquid chromatography atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. Rapid Communications in Mass Spectrometry 12, 1625-1634.
Doerge, D.R., Churchwell, M.I., Rushing, L.G., Bajic, S., 1996. Confirmation of gentian violet and its metabolite leucogentian violet in catfish muscle using liquid chromatography combined with atmospheric pressure ionization mass spectrometry. Rapid Communications in Mass Spectrometry 10, 1479-1484.

Dowling, G., Mulder, P.P., Duffy, C., Regan, L., Smyth, M.R., 2007. Confirmatory analysis of malachite green, leucomalachite green, crystal violet and leucocrystal violet in salmon by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Anal Chim Acta 586, 411-419.
Dubreil, E., Mompelat, S., Kromer, V., Guitton, Y., Danion, M., Morin, T., Hurtaud-Pessel, D., Verdon, E., 2020a. Corrigendum to "Dye residues in aquaculture products: Targeted and metabolomics mass spectrometric approaches to track their abuse [Food Chem. 294 (2019) 355–367]. Food Chemistry 306, 125539.
Dubreil, E., Mompelat, S., Kromer, V., Guitton, Y., Danion, M., Morin, T., Hurtaud-Pessel, D., Verdon, E., 2019. Dye residues in aquaculture products: Targeted and metabolomics mass spectrometric approaches to track their abuse. Food Chemistry 294, 355-367.
Dubreil, E., Sczubelek, L., Burkina, V., Zlabek, V., Sakalli, S., Zamaratskaia, G., Hurtaud-Pessel, D., Verdon, E., 2020b. In vitro investigations of the metabolism of Victoria pure blue BO dye to identify main metabolites for food control in fish. Chemosphere 238.Dubreil, E., Laurentie, M., Delmas, J.M., Danion, M., Morin, T., Hurtaud-Pessel, D., Viel, A., Sanders, P., Verdon, E., 2021. Tissue distribution, metabolism, and elimination of Victoria Pure Blue BO in rainbow trout: Main metabolite as an appropriate residue marker. Chemosphere 262.
Dunn, W.B., Ellis, D.I., 2005. Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. TrAC - Trends in Analytical Chemistry 24, 285-294.
Duxbury, D.F., 1993. The Photochemistry and Photophysics of Triphenylmethane Dyes in Solid and Liquid Media. Chemical Reviews 93, 381-433.

~E~

EFSA, 2013a. Guidance on methodological principles and scientific methods to be taken into account when establishing Reference Points for Action (RPAs) for non-allowed pharmacologically active substances present in food of animal origin. EFSA Journal.
EFSA, 2013b. Guidance on methodological principles and scientific methods to be taken into account when establishing Reference Points for Action (RPAs) for non-allowed pharmacologically active substances present in food of animal origin. EFSA Journal 11, 3195.
EFSA, 2016. Panel on Contaminants in the Food Chain-Malachite green in food. EFSA Journal, p. e04530.
EFSA, Penninks, A., Baert, K., Levorato, S., Binaglia, M., 2017a. Dyes in aquaculture and reference points for action. EFSA Journal. John Wiley & Sons, Ltd, p. e04920.
EFSA, Penninks, A., Baert, K., Levorato, S., Binaglia, M., 2017b. Dyes in aquaculture and reference points for action. EFSA Journal 15, e04920.
Ekman, D.R., Skelton, D.M., Davis, J.M., Villeneuve, D.L., Cavallin, J.E., Schroeder, A., Jensen, K.M., Ankley, G.T., Collette, T.W., 2015. Metabolite profiling of fish skin mucus: A novel approach for minimally-invasive environmental exposure monitoring and surveillance. Environmental Science and Technology 49, 3091-3100.
Eldem, Y., Özer, I., 2004. Electrophilic reactivity of cationic triarylmethane dyes towards proteins and protein-related nucleophiles. Dyes and Pigments 60, 49-54.
Engskog, M.K.R., Haglöf, J., Arvidsson, T., Pettersson, C., 2016. LC–MS based global metabolite profiling: the necessity of high data quality. Metabolomics 12.
Evans, D.H., Piermarini, P.M., Choe, K.P., 2005. The multifunctional fish gill: Dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. Physiological Reviews 85, 97-177.

~F~

Fairman, K., Li, M., Kabadi, S.V., Lumen, A., 2020. Physiologically based pharmacokinetic modeling: A promising tool for translational research and regulatory toxicology. Current Opinion in Toxicology 23-24, 17-22.
Fallah, A.A., Barani, A., 2014. Determination of malachite green residues in farmed rainbow trout in Iran. Food Control 40, 100-105.
FAO-WHO, 2020. GSFA Database.

FAO, 2018. The State of World Fisheries and Aquaculture 2016 (SOFIA): contributing to food security and nutrition for all. Food and Agriculture Organization Rome, p. 200.
Fay, K.A., Fitzsimmons, P.N., Hoffman, A.D., Nichols, J.W., 2017. Comparison of trout hepatocytes and liver S9 fractions as in vitro models for predicting hepatic clearance in fish. Environmental Toxicology and Chemistry 36, 463-471.
Fenaille, F., Barbier Saint-Hilaire, P., Rousseau, K., Junot, C., 2017. Data acquisition workflows in liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry-based metabolomics: Where do we stand? Journal of Chromatography A 1526, 1-12.
Fessard, V., Godard, T., Huet, S., Mourot, A., Poul, J.M., 1999. Mutagenicity of malachite green and leucomalachite green in in vitro tests. Journal of Applied Toxicology 19, 421-430.
Foster, F.J., Woodbury, L., 1936. The use of malachite green as a fish fungicide and antiseptic. Progressive Fish-Culturist 3, 7-9.
FranceAgriMer, 2018. Consommation des produits de la pêche et de l'aquaculture 2017.
Fu, J., Gong, Z., Kelly, B.C., 2019. Metabolomic profiling of zebrafish (Danio rerio) embryos exposed to the antibacterial agent triclosan. Environmental Toxicology and Chemistry 38, 240-249.

~G~

Gall, G.A.E., Crandell, P.A., 1992. The rainbow trout. Aquaculture 100, 1-10.
Gallart-Ayala, H., Chéreau, S., Dervilly-Pinel, G., Bizec, B.L., 2015. Potential of mass spectrometry metabolomics for chemical food safety. Bioanalysis 7, 133-146.
Gaugain, M., Mompelat, S., Fourmond, M.P., Manceau, J., Rolland, J.G., Laurentie, M., Verdon, E., Bellanger, L., Hurtaud-Pessel, D., 2019. A non-targeted LC-HRMS approach for detecting exposure to illegal veterinary treatments: The case of cephalosporins in commercial laying Hens. Journal of Chromatography A 1599, 161-171.
Gessner, T., Mayer, U., 2000. Triarylmethane and Diarylmethane Dyes. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry.
Ghaste, M., Mistrik, R., Shulaev, V., 2016. Applications of fourier transform ion cyclotron resonance (FT-ICR) and orbitrap based high resolution mass spectrometry in metabolomics and lipidomics. International Journal of Molecular Sciences 17.
Giaccone, V., Cammilleri, G., Macaluso, A., Cicero, N., Pulvirenti, A., Vella, A., Ferrantelli, V., 2018. A LC-HRMS after QuEChERS cleanup method for the rapid determination of dye residues in fish products. Food Analytical Methods 11, 625-634.
Giacomoni, F., Le Corguille, G., Monsoor, M., Landi, M., Pericard, P., Petera, M., Duperier, C., Tremblay-Franco, M., Martin, J.F., Jacob, D., Goulitquer, S., Thevenot, E.A., Caron, C., 2015. Workflow4Metabolomics: a collaborative research infrastructure for computational metabolomics. Bioinformatics 31, 1493-1495.
Gibbs, R.S., Murray, S.L., Watson, L.V., Nielsen, B.P., Potter, R.A., Murphy, C.J., 2018. Development and Validation of a Hybrid Screening and Quantitative Method for the Analysis of Eight Classes of Therapeutants in Aquaculture Products by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. Journal of Agricultural and Food Chemistry 66, 4997-5008.
Gika, H.G., Zisi, C., Theodoridis, G., Wilson, I.D., 2016. Protocol for quality control in metabolic profiling of biological fluids by U(H)PLC-MS. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences 1008, 15-25.
Goldacre, R.J., Phillips, J.N., 1949. The ionization of basic triphenylmethane dyes. Journal of the Chemical Society (Resumed), 1724-1732.
Grech, A., Tebby, C., Brochot, C., Bois, F.Y., Bado-Nilles, A., Dorne, J.L., Quignot, N., Beaudouin, R., 2019. Generic physiologically-based toxicokinetic modelling for fish: Integration of environmental factors and species variability. Science of the Total Environment 651, 516-531.
Guan, N.N., Zhou, Q., Lan, T., Zhou, L.F., Zhao, B.W., Wang, W.M., Gao, Z.X., 2018. Is the Nutritional Value of Fish Fillet Related to Fish Maturation or Fish Age? Integrated Analysis of Transcriptomics and Metabolomics in Blunt Snout Bream (Megalobrama amblycephala). Cellular Physiology and Biochemistry 49, 17-39.
Guillouzo, A., 1998. Liver cell models in in vitro toxicology. Environmental Health Perspectives 106, 511-532.

~H~

Hall, Z., Hopley, C., O'Connor, G., 2008. High accuracy determination of malachite green and leucomalachite green in salmon tissue by exact matching isotope dilution mass spectrometry. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences 874, 95-100.
Halme, K., Lindfors, E., Peltonen, K., 2007. A confirmatory analysis of malachite green residues in rainbow trout with liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences 845, 74-79.
Halme, K., Lindfors, E., Peltonen, K., 2004. Determination of malachite green residues in rainbow trout muscle with liquid chromatography and liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. Food Additives and Contaminants 21, 641-648.
Han, X., Nabb, D.L., Yang, C.H., Snajdr, S.I., Mingoia, R.T., 2009. Liver microsomes and S9 from rainbow trout (oncorhynchus mykiss): Comparison of basal-level enzyme activities with rat and determination of xenobiotic intrinsic clearance in support of bioaccumulation assessment. Environmental Toxicology and Chemistry 28, 481-488.
Hardman, M., Makarov, A.A., 2003. Interfacing the orbitrap mass analyzer to an electrospray ion source. Analytical Chemistry 75, 1699-1705.
Hashimoto, J.C., Paschoal, J.A.R., De Queiroz, J.F., Reyes, F.G.R., 2011. Considerations on the use of malachite green in aquaculture and analytical aspects of determining the residues in fish: A review. Journal of Aquatic Food Product Technology 20, 273-294.
Hashimoto, J.C., Paschoal, J.A.R., Queiroz, S.C.N., Ferracini, V.L., Assalin, M.R., Reyes, F.G.R., 2012. A simple method for the determination of malachite green and leucomalachite green residues in fish by a modified quechers extraction and LC/MS/MS. Journal of AOAC International 95, 913-922.
Hedrick, R.P., MacConnell, E., de Kinkelin, P., 1993. Proliferative kidney disease of salmonid fish. Annual Review of Fish Diseases 3, 277-290.
Henderson, A.L., Schmitt, T.C., Heinze, T.M., Cerniglia, C.E., 1997. Reduction of malachite green to leucomalachite green by intestinal bacteria. Applied and Environmental Microbiology 63, 4099-4101.
Hermo, M.P., Gómez-Rodríguez, P., Barbosa, J., Barrón, D., 2013. Metabolomic assays of amoxicillin, cephapirin and ceftiofur in chicken muscle: Application to treated chicken samples by liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 85, 169-178.
Hernando, M.D., Mezcua, M., Suárez-Barcena, J.M., Fernández-Alba, A.R., 2006. Liquid chromatography with time-of-flight mass spectrometry for simultaneous determination of chemotherapeutant residues in salmon. Analytica Chimica Acta 562, 176-184.
Holmes, E., Loo, R.L., Cloarec, O., Coen, M., Tang, H., Maibaum, E., Bruce, S., Chan, Q., Elliott, P., Stamler, J., Wilson, I.D., Lindon, J.C., Nicholson, J.K., 2007. Detection of urinary drug metabolite (xenometabolome) signatures in molecular epidemiology studies via statistical total correlation (NMR) spectroscopy. Analytical Chemistry 79, 2629-2640.
Hormazabal, V., Steffenak, I., Yndestad, M., 1992. A time and cost-effective assay for the determination of residues of malachite green in fish tissues by hplc. Journal of Liquid Chromatography 15, 2035-2044.
Horwitz, W., Kamps, L.R., Boyer, K.W., 1980. Quality assurance in the analysis of foods and trace constituents. Journal - Association of Official Analytical Chemists 63, 1344-1354.
Hu, Q., Noll, R.J., Li, H., Makarov, A., Hardman, M., Cooks, R.G., 2005. The Orbitrap: A new mass spectrometer. Journal of Mass Spectrometry 40, 430-443.
Hubert, P., Nguyen-Huu, J.J., Boulanger, B., Chapuzet, E., Chiap, P., Cohen, N., Compagnon, P.A., Dewé, W., Feinberg, M., Lallier, M., Laurentie, M., Mercier, N., Muzard, G., Nivet, C., Valat, L., 2004. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: A SFSTP proposal - Part I. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 36, 579-586.
Hubert, P., Nguyen-Huu, J.J., Boulanger, B., Chapuzet, E., Chiap, P., Cohen, N., Compagnon, P.A., Dewé, W., Feinberg, M., Lallier, M., Laurentie, M., Mercier, N., Muzard, G., Nivet, C., Valat, L., Rozet, E., 2007a. Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal - Part II. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 45, 70-81.
Hubert, P., Nguyen-Huu, J.J., Boulanger, B., Chapuzet, E., Cohen, N., Compagnon, P.A., Dewé, W., Feinberg, M., Laurentie, M., Mercier, N., Muzard, G., Valat, L., Rozet, E., 2007b. Harmonization of

strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal-Part III. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 45, 82-96.
Hurtaud-Pessel, D., Couëdor, P., Verdon, E., 2011. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of dye residues in aquaculture products: Development and validation. Journal of Chromatography A 1218, 1632-1645.
Hurtaud-Pessel, D., Couëdor, P., Verdon, E., Dowell, D., 2013. Determination of residues of three triphenylmethane dyes and their metabolites (Malachite green, leuco malachite green, crystal violet, leuco crystal violet, and brilliant green) in aquaculture products by LC/MS/MS: First action 2012.25. Journal of AOAC International 96, 1152-1157.

~I~

ISO, 1994. ISO 5725-1:1994(fr): Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure — Partie 1: Principes généraux et définitions.
ISO/IEC, 2005. ISO/IEC 17025: Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais

~J~

JCGM, 2008. Évaluation des données de mesure — Guide pour l'expression de l'incertitude de mesure. JCGM 100:2008(F) GUM 1995 avec des corrections mineures.
Jiang, Y., Xie, P., Liang, G., 2009. Distribution and depuration of the potentially carcinogenic malachite green in tissues of three freshwater farmed Chinese fish with different food habits. Aquaculture 288, 1-6.
Jönsson, M.E., Gao, K., Olsson, J.A., Goldstone, J.V., Brandt, I., 2010. Induction patterns of new CYP1 genes in environmentally exposed rainbow trout. Aquatic Toxicology 98, 311-321.
Josić, D., Peršurić, Ž., Rešetar, D., Martinović, T., Saftić, L., Kraljević Pavelić, S., 2017. Use of Foodomics for Control of Food Processing and Assessing of Food Safety. Advances in Food and Nutrition Research, pp. 187-229.
Junza, A., Saurina, J., Barrón, D., Minguillón, C., 2016. Metabolic profile modifications in milk after enrofloxacin administration studied by liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1460, 92-99.
Justino, C.I.L., Duarte, K.R., Freitas, A.C., Panteleitchouk, T.S.L., Duarte, A.C., Rocha-Santos, T.A.P., 2016. Contaminants in aquaculture: Overview of analytical techniques for their determination. TrAC Trends in Analytical Chemistry 80, 293-310.

~K~

Kaabia, Z., Laparre, J., Cesbron, N., Le Bizec, B., Dervilly-Pinel, G., 2018. Comprehensive steroid profiling by liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 183, 106-115.
Kaplan, M., Olgun, E.O., Karaoglu, O., 2014. A rapid and simple method for simultaneous determination of triphenylmethane dye residues in rainbow trouts by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J Chromatogr A 1349, 37-43.
Ketkar, M.B., Mohr, U., 1982. The chronic effects of magenta, paramagenta and phenyl-β-naphthylamine in rats after intragastric administration. Cancer Letters 16, 203-206.
Kim, S., Kim, J., Yun, E.J., Kim, K.H., 2016. Food metabolomics: from farm to human. Current Opinion in Biotechnology 37, 16-23.
Kim, S.W., Less, J.F., Wang, L., Yan, T., Kiron, V., Kaushik, S.J., Lei, X.G., 2019. Meeting Global Feed Protein Demand: Challenge, Opportunity, and Strategy. Annual Review of Animal Biosciences 7, 221-243.
Knutsen, H.K., Alexander, J., Barregård, L., Bignami, M., Brüschweiler, B., Ceccatelli, S., Cottrill, B., Dinovi, M., Edler, L., Grasl-Kraupp, B., Hogstrand, C., Nebbia, C.S., Oswald, I.P., Petersen, A., Rose,

M., Roudot, A.C., Schwerdtle, T., Vollmer, G., Vleminckx, C., Wallace, H., Filipič, M., Fürst, P., O'Keeffe, M., Penninks, A., Van Leeuwen, R., Baert, K., Hoogenboom, L.R., 2018. Update: methodological principles and scientific methods to be taken into account when establishing Reference Points for Action (RPAs) for non-allowed pharmacologically active substances present in food of animal origin. EFSA Journal 16.
Kouassi Nzoughet, J.J., Dervilly-Pinel, G., Chéreau, S., Biancotto, G., Monteau, F., Elliott, C.T., Le Bizec, B., 2015. First insights into serum metabolomics of trenbolone/estradiol implanted bovines; screening model to predict hormone-treated and control animals' status. Metabolomics 11, 1184-1196.
Kovacic, P., Somanathan, R., 2014. Toxicity of imine-iminium dyes and pigments: Electron transfer, radicals, oxidative stress and other physiological effects. Journal of Applied Toxicology 34, 825-834.
Krøvel, A.V., Winterthun, S., Holen, E., Olsvik, P.A., 2011. Development of a co-culture model for in vitro toxicological studies in Atlantic salmon. Toxicology in Vitro 25, 1143-1152.
Kwan, P.P., Banerjee, S., Shariff, M., Ishak, N.A.S., Yusoff, F.M., 2018. Quantitative analysis of malachite green and leucomalachite green residues in fish purchased from the markets in Malaysia. Food Control 92, 101-106.

~L~

Labine, L.M., Simpson, M.J., 2020. The use of nuclear magnetic resonance (NMR) and mass spectrometry (MS)–based metabolomics in environmental exposure assessment. Current Opinion in Environmental Science and Health 15, 7-15.
Lakra, W.S., Swaminathan, T.R., Joy, K.P., 2011. Development, characterization, conservation and storage of fish cell lines: A review. Fish Physiology and Biochemistry 37, 1-20.
Lammel, T., Tsoukatou, G., Jellinek, J., Sturve, J., 2019. Development of three-dimensional (3D) spheroid cultures of the continuous rainbow trout liver cell line RTL-W1. Ecotoxicology and Environmental Safety 167, 250-258.
Lee, J.B., Kim, H.Y., Jang, Y.M., Song, J.Y., Woo, S.M., Park, M.S., Lee, H.S., Lee, S.K., Kim, M., 2010. Determination of malachite green and crystal violet in processed fish products. Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment 27, 953-961.
Lee, K.C., Wu, J.L., Cai, Z., 2006. Determination of malachite green and leucomalachite green in edible goldfish muscle by liquid chromatography-ion trap mass spectrometry. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences 843, 247-251.
Li, Y.h., Yang, T., Qi, X.l., Qiao, Y.w., Deng, A.p., 2008. Development of a group selective molecularly imprinted polymers based solid phase extraction of malachite green from fish water and fish feed samples. Analytica Chimica Acta 624, 317-325.
Lin, C.W., Shulok, J.R., Kirley, S.D., Cincotta, L., Foley, J.W., Lin, C.W., 1991. Lysosomal Localization and Mechanism of Uptake of Nile Blue Photosensitizers in Tumor Cells. Cancer Research 51, 2710-2719.
Long, C., Mai, Z., Yang, Y., Zhu, B., Xu, X., Lu, L., Zou, X., 2009. Determination of multi-residue for malachite green, gentian violet and their metabolites in aquatic products by high-performance liquid chromatography coupled with molecularly imprinted solid-phase extraction. Journal of Chromatography A 1216, 2275-2281.
López-Gutiérrez, N., Romero-González, R., Plaza-Bolaños, P., Martínez-Vidal, J.L., Garrido-Frenich, A., 2013. Simultaneous and Fast Determination of Malachite Green, Leucomalachite Green, Crystal Violet, and Brilliant Green in Seafood by Ultrahigh Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. Food Analytical Methods 6, 406-414.
López-Ruiz, R., Romero-González, R., Garrido Frenich, A., 2019. Metabolomics approaches for the determination of multiple contaminants in food. Current Opinion in Food Science 28, 49-57.
Lulijwa, R., Rupia, E.J., Alfaro, A.C., 2019. Antibiotic use in aquaculture, policies and regulation, health and environmental risks: a review of the top 15 major producers. Reviews in Aquaculture 0.
Lunestad, B.T., Samuelsen, O., 2008. 4 - Veterinary drug use in aquaculture. in: Lie, Ø. (Ed.). Improving Farmed Fish Quality and Safety. Woodhead Publishing, pp. 97-127.

~M~

Máchová, J., Svobodová, Z., Svobodník, J., Piačka, V., Vykusová, B., Kocová, A., 1996. Persistence of malachite green in tissues of rainbow trout after a long-term therapeutic bath. Acta Veterinaria Brno 65, 151-159.
Martinez Bueno, M.J., Herrera, S., Ucles, A., Aguera, A., Hernando, M.D., Shimelis, O., Rudolfsson, M., Fernandez-Alba, A.R., 2010. Determination of malachite green residues in fish using molecularly imprinted solid-phase extraction followed by liquid chromatography-linear ion trap mass spectrometry. Anal Chim Acta 665, 47-54.
Martínez Bueno, M.J., Herrera, S., Uclés, A., Agüera, A., Hernando, M.D., Shimelis, O., Rudolfsson, M., Fernández-Alba, A.R., 2010. Determination of malachite green residues in fish using molecularly imprinted solid-phase extraction followed by liquid chromatography-linear ion trap mass spectrometry. Analytica Chimica Acta 665, 47-54.
Mayr, M., 2008. Metabolomics: ready for the prime time? Circulation. Cardiovascular genetics 1, 58-65.
Meyer, F.P., 1991. Aquaculture disease and health management. Journal of animal science 69, 4201-4208.
Meyer, F.P., Jorgenson, T.A., 1983. Teratological and other effects of malachite green on development of rainbow trout and rabbits. Transactions of the American Fisheries Society 112, 818-824.
Miggiels, P., Wouters, B., van Westen, G.J.P., Dubbelman, A.C., Hankemeier, T., 2019. Novel technologies for metabolomics: More for less. TrAC - Trends in Analytical Chemistry 120.
Moco, S., Vervoort, J., Moco, S., Bino, R.J., De Vos, R.C.H., Bino, R., 2007. Metabolomics technologies and metabolite identification. TrAC - Trends in Analytical Chemistry 26, 855-866.
Munro, I.C., Renwick, A.G., Danielewska-Nikiel, B., 2008. The Threshold of Toxicological Concern (TTC) in risk assessment. Toxicology Letters 180, 151-156.

~N~

National Academies of Sciences, E., Medicine, 2017. Using 21st Century Science to Improve Risk-Related Evaluations. Washington, D.C. : National Academies Press, 2017. Â©2017.
Nebbia, C., Girolami, F., Carletti, M., Gasco, L., Zoccarato, I., Giuliano Albo, A., 2017. In vitro interactions of malachite green and leucomalachite green with hepatic drug-metabolizing enzyme systems in the rainbow trout (Onchorhyncus mykiss). Toxicology Letters 280, 41-47.
Ngan, D.K., Ye, L., Wu, L., Xia, M., Rossoshek, A., Simeonov, A., Huang, R., 2019. Bioactivity Signatures of Drugs vs. Environmental Chemicals Revealed by Tox21 High-Throughput Screening Assays. Frontiers in Big Data 2.
NTP, 2005. Toxicology and carcinogenesis studies of malachite green chloride and leucomalachite green. (CAS NOS. 569-64-2 and 129-73-7) in F344/N rats and B6C3F1 mice (feed studies). National Toxicology Program technical report series, pp. 1-312.

~O~

OECD, 2018. Guidance document on the determination of in vitro intrinsic clearance using cryopreserved hepatocytes (RT-HEP) or liver sub-cellular fractions (RT-S9) from rainbow trout and extrapolation to in vivo intrinsic clearance series on testing and assessment. 280.
Okocha, R.C., Olatoye, I.O., Adedeji, O.B., 2018. Food safety impacts of antimicrobial use and their residues in aquaculture. Public Health Reviews 39.
Oláh, J., Farkas, J., 1978. Effect of temperature, pH, antibiotics, formalin and malachite green on the growth and survival of Saprolegnia and Achlya parastic on fish. Aquaculture 13, 273-288.
Oliver, S.G., Winson, M.K., Kell, D.B., Baganz, F., 1998. Systematic functional analysis of the yeast genome. Trends in Biotechnology 16, 373-378.
Oliveri Conti, G., Copat, C., Wang, Z., D'Agati, P., Cristaldi, A., Ferrante, M., 2015. Determination of illegal antimicrobials in aquaculture feed and fish: An ELISA study. Food Control 50, 937-941.

Oplatowska, M., Donnelly, R.F., Majithiya, R.J., Glenn Kennedy, D., Elliott, C.T., 2011. The potential for human exposure, direct and indirect, to the suspected carcinogenic triphenylmethane dye Brilliant Green from green paper towels. Food and Chemical Toxicology 49, 1870-1876.
Orland, W.K., McClure, L.S., 1959. Selected Triphenylmethane Dyes as Acid-Base Indicators in Glacial Acetic Acid. Analytical Chemistry 31, 1876-1879.
Oros, G., Cserhati, T., Forgacs, E., 2002. Antifungal activity of some trityl-based synthetic dyes. Environmental Toxicology and Chemistry 21, 1206-1212.
Oz, M., Lorke, D.E., Hasan, M., Petroianu, G.A., 2011. Cellular and molecular actions of Methylene Blue in the nervous system. Medicinal Research Reviews 31, 93-117.

~P~

Parsons, D.M., Cook, D.G., Thompson, A., Ranjard, L., Zarate, E., Dunphy, B.J., 2018. Discrimination of juvenile snapper (Chrysophrys auratus) growth and nutrition via metabolomic GC-MS methods. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 506, 72-81.
Peng, T., Royer, A.L., Guitton, Y., Le Bizec, B., Dervilly-Pinel, G., 2017. Serum-based metabolomics characterization of pigs treated with ractopamine. Metabolomics 13.
Pérez-Sánchez, T., Mora-Sánchez, B., Balcázar, J.L., 2018. Biological Approaches for Disease Control in Aquaculture: Advantages, Limitations and Challenges. Trends in Microbiology 26, 896-903.
Plakas, S.M., El Said, K.R., Stehly, G.R., Gingerich, W.H., Allen, J.L., 1996. Uptake, tissue distribution, and metabolism of malachite green in the channel catfish [Ictalurus punctatus]. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 53, 1427-1433.
Poe, W.E., Wilson, R.P., 1983. Absorption Of malachite green by channel catfish. Progressive Fish-Culturist 45, 228-229.

~R~

Raterink, R.J., Lindenburg, P.W., Vreeken, R.J., Ramautar, R., Hankemeier, T., 2014. Recent developments in sample-pretreatment techniques for mass spectrometry-based metabolomics. TrAC - Trends in Analytical Chemistry 61, 157-167.
Rathahao-Paris, E., Alves, S., Junot, C., Tabet, J.C., 2016. High resolution mass spectrometry for structural identification of metabolites in metabolomics. Metabolomics 12, 1-15.
Reverter, M., Sasal, P., Banaigs, B., Lecchini, D., Lecellier, G., Tapissier-Bontemps, N., 2017. Fish mucus metabolome reveals fish life-history traits. Coral Reefs 36, 463-475.
Reyns, T., Belpaire, C., Geeraerts, C., Van Loco, J., 2014. Multi-dye residue analysis of triarylmethane, xanthene, phenothiazine and phenoxazine dyes in fish tissues by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 953-954, 92-101.
Rintamäki-Kinnunen, P., Rahkonen, M., Mykrä, H., Valtonen, E.T., 2005. Treatment of ichthyophthiriasis after malachite green. II. Earth ponds at salmonid farms. Diseases of Aquatic Organisms 66, 15-20.
Rodrigues, P.A., Ferrari, R.G., Conte-Junior, C.A., 2018. Application of molecular tools to elucidate the microbiota of seafood. Journal of Applied Microbiology 124, 1347-1365.
Rosa, J., Lemos, M.F.L., Crespo, D., Nunes, M., Freitas, A., Ramos, F., Pardal, M.Â., Leston, S., 2020. Integrated multitrophic aquaculture systems – Potential risks for food safety. Trends in Food Science and Technology 96, 79-90.
Ross, L.G., Ward, K.M.H., Ross, B., 1985. The effects of formalin, malachite green and suspended solids on the respiratory activity of rainbow trout, Salmo gairdneri Richardson. Aquaculture Research 16, 129-138.
Roszkowska, A., Yu, M., Bessonneau, V., Ings, J., McMaster, M., Smith, R., Bragg, L., Servos, M., Pawliszyn, J., 2019. In vivo solid-phase microextraction sampling combined with metabolomics and toxicological studies for the non-lethal monitoring of the exposome in fish tissue. Environmental Pollution 249, 109-115.
Roybal, J.E., Pfenning, A.P., Munns, R.K., Holland, D.C., Hurlbut, J.A., Long, A.R., 1995. Determination of malachite green and its metabolite, leucomalachite green, in catfish (Ictalurus

punctatus) tissue by liquid chromatography with visible detection. Journal of AOAC International 78, 453-457.
Ryan, D., Robards, K., 2006. Metabolomics: The greatest omics of them all? Analytical Chemistry 78, 7954-7958.

~S~

Schafer Jr, E.W., Bowles Jr, W.A., 1985. Acute oral toxicity and repellency of 933 chemicals to house and deer mice. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 14, 111-129.
Scherpenisse, P., Bergwerff, A.A., 2005. Determination of residues of malachite green in finfish by liquid chromatography tandem mass spectrometry. Analytica Chimica Acta 529, 173-177.
Schneider, M.J., Andersen, W.C., 2015. Determination of triphenylmethane dyes and their metabolites in salmon, catfish, and shrimp by LC-MS/MS using AOAC first action method 2012.25: Collaborative study. Journal of AOAC International 98, 658-670.
Schuetze, A., Heberer, T., Juergensen, S., 2008. Occurrence of residues of the veterinary drug malachite green in eels caught downstream from municipal sewage treatment plants. Chemosphere 72, 1664-1670.
Senyuva, H.Z., Gökmen, V., Sarikaya, E.A., 2015. Future perspectives in Orbitrap™-high-resolution mass spectrometry in food analysis: a review. Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment 32, 1568-1606.
Serra-Majem, L., Román-Viñas, B., Sanchez-Villegas, A., Guasch-Ferré, M., Corella, D., La Vecchia, C., 2019. Benefits of the Mediterranean diet: Epidemiological and molecular aspects. Molecular Aspects of Medicine 67, 1-55.
Shi, L., Brunius, C., Bergdahl, I.A., Johansson, I., Rolandsson, O., Donat Vargas, C., Kiviranta, H., Hanhineva, K., Åkesson, A., Landberg, R., 2019. Joint analysis of metabolite markers of fish intake and persistent organic pollutants in relation to type 2 diabetes risk in Swedish Adults. Journal of Nutrition 149, 1413-1423.
Singh, S., Das, M., Khanna, S.K., 1994. Biodegradation of Malachite Green and Rhodamine B by Cecal Microflora of Rats. Biochemical and Biophysical Research Communications 200, 1544-1550.
Smith, S., Gieseker, C., Reimschuessel, R., Decker, C.S., Carson, M.C., 2009. Simultaneous screening and confirmation of multiple classes of drug residues in fish by liquid chromatography-ion trap mass spectrometry. J Chromatogr A 1216, 8224-8232.
Srivastava, S., Sinha, R., Roy, D., 2004. Toxicological effects of malachite green. Aquatic Toxicology 66, 319-329.
Stella, R., Dervilly-Pinel, G., Bovo, D., Mastrorilli, E., Royer, A.L., Angeletti, R., Le Bizec, B., Biancotto, G., 2017. Metabolomics analysis of liver reveals profile disruption in bovines upon steroid treatment. Metabolomics 13.
Stenvinkel, P., 2020. The One Health concept – the health of humans is intimately linked with the health of animals and a sustainable environment. Journal of Internal Medicine 287, 223-225.
Steuer, A.E., Brockbals, L., Kraemer, T., 2019. Metabolomic strategies in biomarker research-new approach for indirect identification of drug consumption and sample manipulation in clinical and forensic toxicology? Frontiers in Chemistry 7.
Storey, J.M., Clark, S.B., Johnson, A.S., Andersen, W.C., Turnipseed, S.B., Lohne, J.J., Burger, R.J., Ayres, P.R., Carr, J.R., Madson, M.R., 2014. Analysis of sulfonamides, trimethoprim, fluoroquinolones, quinolones, triphenylmethane dyes and methyltestosterone in fish and shrimp using liquid chromatography-mass spectrometry. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 972, 38-47.
Sudova, E., Machova, J., Svobodova, Z., Vesely, T., 2007. Negative effects of malachite green and possibilities of its replacement in the treatment of fish eggs and fish: A review. Veterinarni Medicina 52, 527-539.

~T~

Tacal, Ö., Özer, I., 2004. Adduct-forming tendencies of cationic triarylmethane dyes with proteins: Metabolic and toxicological implications. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology 18, 253-256.

Tao, Y., Chen, D., Chao, X., Yu, H., Yuanhu, P., Liu, Z., Huang, L., Wang, Y., Yuan, Z., 2011. Simultaneous determination of malachite green, gentian violet and their leuco-metabolites in shrimp and salmon by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with accelerated solvent extraction and auto solid-phase clean-up. Food Control 22, 1246-1252.
Tarbin, J.A., Chan, D., Stubbings, G., Sharman, M., 2008. Multiresidue determination of triarylmethane and phenothiazine dyes in fish tissues by LC-MS/MS. Anal Chim Acta 625, 188-194.
Thibaut, R., Schnell, S., Porte, C., 2009. Assessment of metabolic capabilities of PLHC-1 and RTL-W1 fish liver cell lines. Cell Biology and Toxicology 25, 611-622.
Turnipseed, S.B., Andersen, W.C., Roybal, J.E., 2005. Determination and confirmation of malachite green and leucomalachite green residues in salmon using liquid chromatography/mass spectrometry with no-discharge atmospheric pressure chemical ionization. Journal of AOAC International 88, 1312-1317.
Turnipseed, S.B., Roybal, J., Rupp, H.S., Hurlbut, J.A., Long, A.R., 1995. Particle beam liquid chromatography-mass spectrometry of triphenylmethane dyes: application to confirmation of malachite green in incurred catfish tissue. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications 670, 55-62.
Turnipseed, S.B., Storey, J.M., Wu, I.L., Gieseker, C.M., Hasbrouck, N.R., Crosby, T.C., Andersen, W.C., Lanier, S., Casey, C.R., Burger, R., Madson, M.R., 2018. Application and evaluation of a high-resolution mass spectrometry screening method for veterinary drug residues in incurred fish and imported aquaculture samples. Analytical and Bioanalytical Chemistry 410, 5529-5544.

~U~

Uchea, C., Owen, S.F., Chipman, J.K., 2015. Functional xenobiotic metabolism and efflux transporters in trout hepatocyte spheroid cultures. Toxicology Research 4, 494-507.
Uchea, C., Sarda, S., Schulz-Utermoehl, T., Owen, S., Chipman, K.J., 2013. In vitro models of xenobiotic metabolism in trout for use in environmental bioaccumulation studies. Xenobiotica 43, 421-431.

~V~

Van De Riet, J.M., Murphy, C.J., Pearce, J.N., Potter, R.A., Burns, B.G., 2005. Determination of malachite green and leucomalachite green in a variety of aquacultured products by liquid chromatography with tandem mass spectrometry detection. Journal of AOAC International 88, 744-749.
Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. Environmental Toxicology and Pharmacology 13, 57-149.
Verdon, E., Bessiral, M., Chotard, M.P., Couëdor, P., Fourmond, M.P., Fuselier, R., Gaugain, M., Gautier, S., Hurtaud-Pessel, D., Laurentie, M., Pirotais, Y., Roudaut, B., Sanders, P., 2015. The monitoring of triphenylmethane dyes in aquaculture products through the European Union network of official control laboratories. Journal of AOAC International 98, 649-657.
Vestergren, A.S., Zlabek, V., Pickova, J., Zamaratskaia, G., 2012. Tolbutamide hydroxylation by hepatic microsomes from Atlantic salmon (Salmo salar L.). Molecular Biology Reports 39, 6867-6873.
Villar-Pulido, M., Gilbert-Lopez, B., Garcia-Reyes, J.F., Martos, N.R., Molina-Diaz, A., 2011. Multiclass detection and quantitation of antibiotics and veterinary drugs in shrimps by fast liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. Talanta 85, 1419-1427.
Vuckovic, D., 2012. Current trends and challenges in sample preparation for global metabolomics using liquid chromatography-mass spectrometry. Analytical and Bioanalytical Chemistry 403, 1523-1548.

~W~

Wan, H., Weng, S., Liang, L., Lu, Q., He, J., 2011. Evaluation of the developmental toxicity of leucomalachite green administered orally to rats. Food and Chemical Toxicology 49, 3031-3037.
Wang, J., Gao, F., Liu, Z., Qiao, M., Niu, X., Zhang, K.Q., Huang, X., 2012. Pathway and Molecular Mechanisms for Malachite Green Biodegradation in Exiguobacterium sp. MG2. PLoS ONE 7.

Want, E.J., Nordström, A., Morita, H., Siuzdak, G., 2007. From exogenous to endogenous: The inevitable imprint of mass spectrometry in metabolomics. Journal of Proteome Research 6, 459-468.
Wei, J.Z., Li, H., Yu, H., 2013. Ichthyophthiriasis: emphases on the epizootiology. Letters in Applied Microbiology 57, 91-101.
Wen, B., Jin, S.R., Chen, Z.Z., Gao, J.Z., 2018. Physiological responses to cold stress in the gills of discus fish (Symphysodon aequifasciatus) revealed by conventional biochemical assays and GC-TOF-MS metabolomics. Science of the Total Environment 640-641, 1372-1381.
Werth, G., Boiteux, A., 1968. Toxicity of triphenylmethane dyes - Malachite-green as an uncoupling agent of oxydative phosphorylation in vivo and in vitro. Archiv fur Toxikologie 23, 82-103.
Wolf, K., Quimby, M.C., 1976. Procedures for subculturing fish cells and propagating fish cell lines. Tissue Culture Association Manual 2, 471-474.
Wolf, K., Rumsey, G., 1985. The Representative Research Animal: Why Rainbow Trout (Salmo gairdneri Rich.)? Journal of Applied Ichthyology 1, 131-138.
World Health, O., International Programme on Chemical, S., 1993. Biomarkers and risk assessment : concepts and principles / published under the joint sponsorship of the United Nations environment Programme, the International Labour Organisation, and the World Health Organization. World Health Organization, Geneva.
Wu, X., Zhang, G., Wu, Y., Hou, X., Yuan, Z., 2007. Simultaneous determination of malachite green, gentian violet and their leuco-metabolites in aquatic products by high-performance liquid chromatography-linear ion trap mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1172, 121-126.
Wu, Y., Bi, Y., Bingga, G., Li, X., Zhang, S., Li, J., Li, H., Ding, S., Xia, X., 2015. Metabolomic analysis of swine urine treated with β<inf>2</inf>-agonists by ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1400, 74-81.
Wurtsbaugh, W.A., Tapia, R.A., 1988. Mass Mortality of fishes in Lake Titicaca (Peru-Bolivia) associated with the protozoan parasite Ichthyophthirius multifiliis. Transactions of the American Fisheries Society 117, 213-217.

~X~

Xu, Y.J., Tian, X.H., Zhang, X.Z., Gong, X.H., Liu, H.H., Zhang, H.J., Huang, H., Zhang, L.M., 2012. Simultaneous determination of malachite green, crystal violet, methylene blue and the metabolite residues in aquatic products by ultra-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. J Chromatogr Sci 50, 591-597.

~Y~

Yoon, M., Clewell, H.J., 2016. Addressing early life sensitivity using physiologically based pharmacokinetic modeling and in vitro to in vivo extrapolation. Toxicological Research 32, 15-20.

~Z~

Zhao, F., Gao, X., Tang, Z., Luo, X., Wu, M., Xu, J., Fu, X., 2017. Development of a simple multi-residue determination method of 80 veterinary drugs in Oplegnathus punctatus by liquid chromatography coupled to quadrupole Orbitrap mass spectrometry. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences 1065-1066, 20-28.
Zhao, H., Chong, J., Tang, R., Li, L., Xia, J., Li, D., 2018. Metabolomics investigation of dietary effects on flesh quality in grass carp (Ctenopharyngodon idellus). GigaScience 7.
Ziarrusta, H., Mijangos, L., Picart-Armada, S., Irazola, M., Perera-Lluna, A., Usobiaga, A., Prieto, A., Etxebarria, N., Olivares, M., Zuloaga, O., 2018. Non-targeted metabolomics reveals alterations in liver and plasma of gilt-head bream exposed to oxybenzone. Chemosphere 211, 624-631.
Zlabek, V., Burkina, V., Borrisser-Pairó, F., Sakalli, S., Zamaratskaia, G., 2016. Phase I metabolism of 3-methylindole, an environmental pollutant, by hepatic microsomes from carp (Cyprinus carpio) and rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Chemosphere 150, 304-310.

Annexes

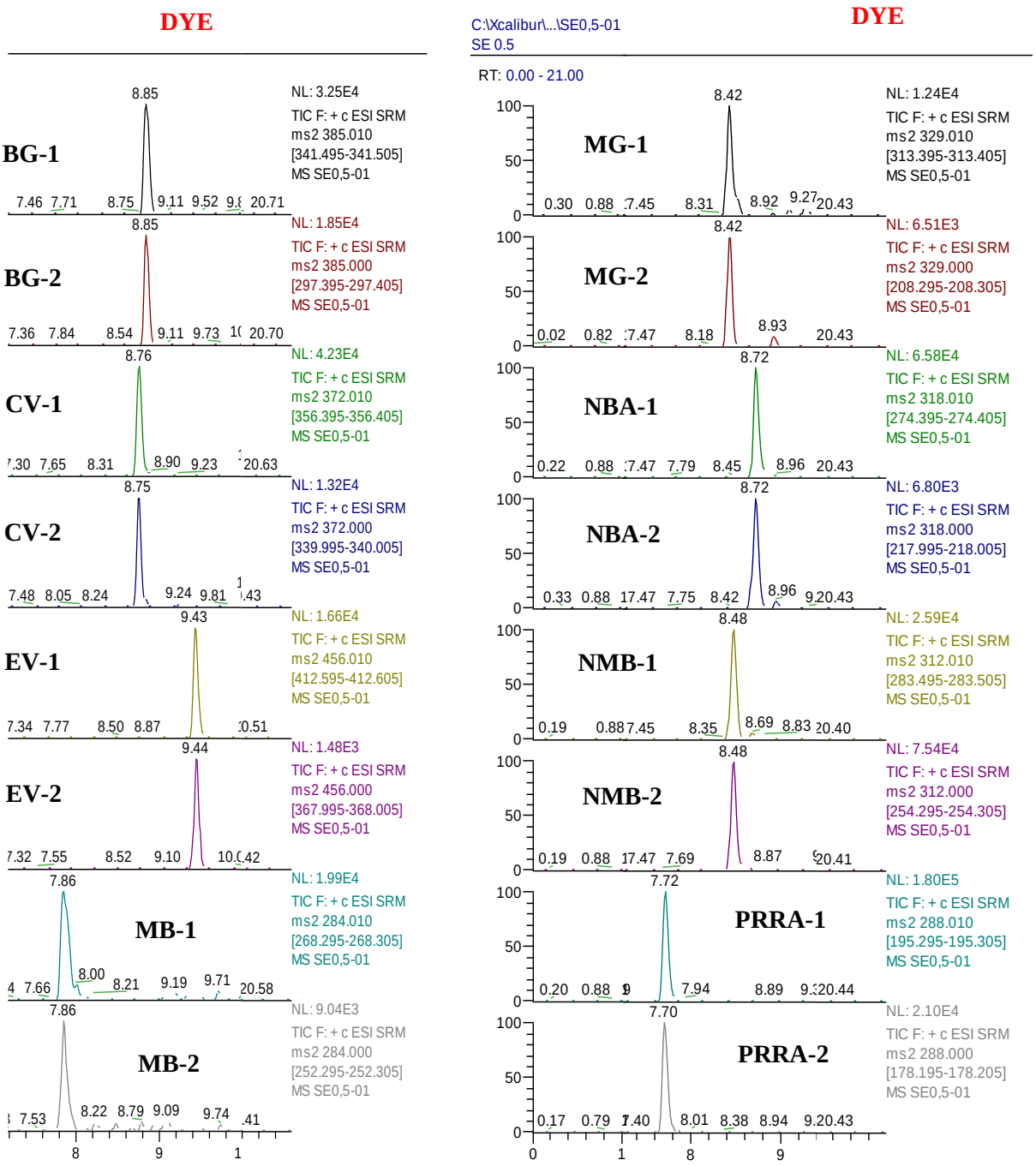
Annexe n° 1 : Transitions MRM des colorants et de résidus marqueurs

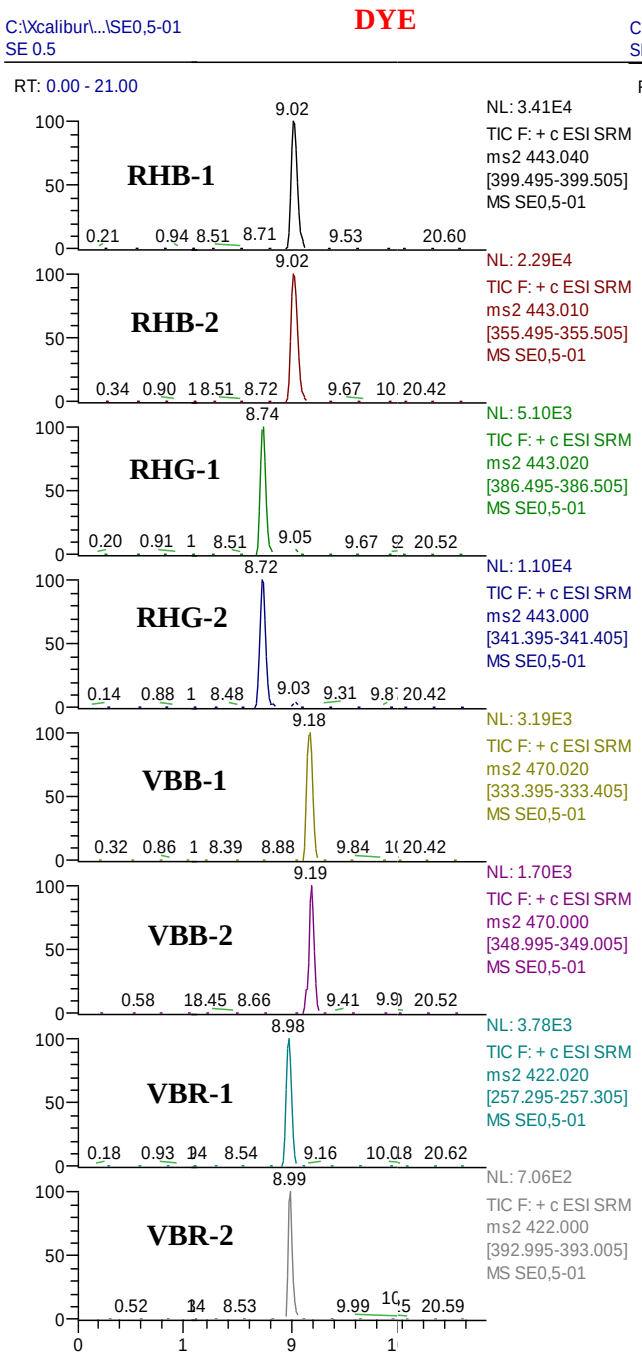
	Transition	Ion précurseur (m/z)	Ions produits (m/z)	Temps de rétentions	Tube Lens	Energie de collision (V)
CV	1	372	356.45	8.79	112.37	35
CV	2	372	340.00			58
LCV	1	374	358.00	12.45	110.87	35
LCV	2	374	239.00			45
VBB	1	470	333.00	9.20	131.64	56
VBB	2	470	349.00			30
AZB	1	270	254.31	7.84	98.11	36
AZB	2	270	212.00			44
VBR	1	422	257.00	9.00	123.13	54
VBR	2	422	393.00			30
MB	1	284	268.31	7.87	93.10	31
MB	2	284	252.27			50
BG	1	385	341.46	8.87	113.62	40
BG	2	385	297.37			56
LBG	1	387	343.53	12.45	132.64	25
LBG	2	387	281.49			35
RHB	1	443	399.54	9.16	128.39	41
RHB	2	443	355.49			57
MG	1	329	313.40	8.45	105.87	32
MG	2	329	208.30			31
LMG	1	331	239.41	12.68	113.37	33
LMG	2	331	316.35			19
EV	1	456	412.56	9.47	125.89	37
EV	2	456	368.00			50
NBA	1	318	274.00	8.76	111.62	30
NBA	2	318	217.00			60
RHG	1	443	386.00	8.75	124.13	39
RHG	2	443	341.42			44
NMB	1	312	283.46	8.49	114.37	28
NMB	2	312	254.29			39
PRRA	1	288	195.27	7.72	112.12	30
PRRA	2	288	178.23			36
VPBO	1	478	434.57	9.45	132.39	38
VPBO	2	478	390.48			50
TRDA	1	517	464.7	10.15	80.00	15
GCDA	1	450	414.6	11.00	47.00	14
DCA	1	410	357.5	11.50	47.00	13
DLVPBO	1	452	303.3	10.36	110	30
DLVPBO	2	452	423.3		110	30

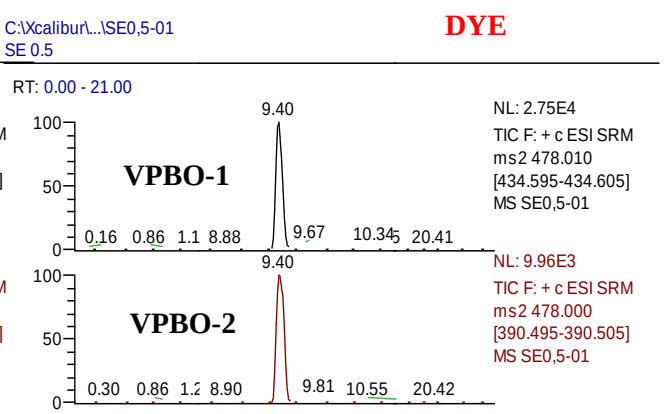
Annexe 2 : Transitions des standards interne des colorants

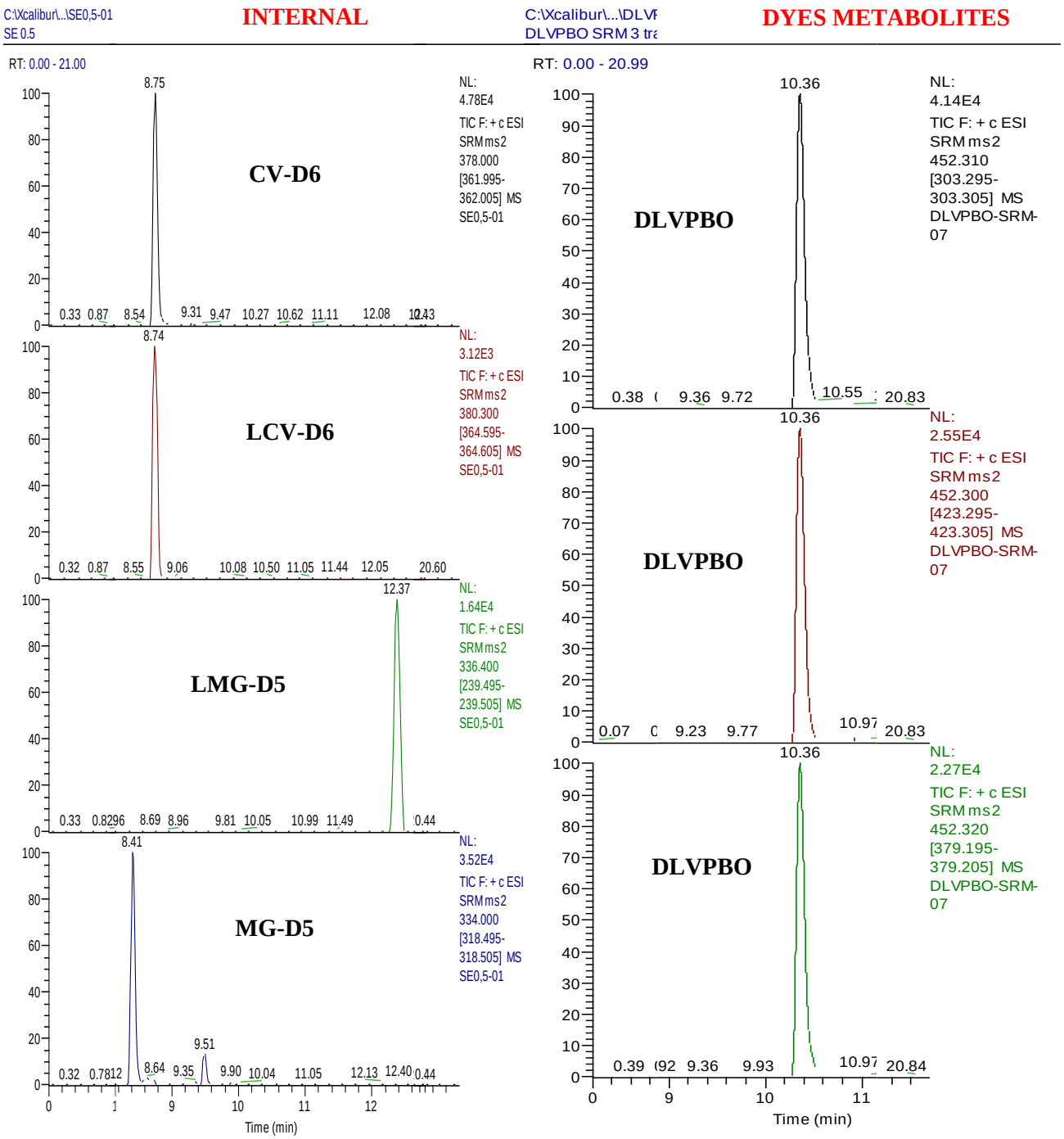
	Transition	Ion précurseur (m/z)	Ions produits (m/z)	Temps de rétention	Tube Lens	Energie de collision
MG-D_5	1	334	318.47	8.44	104.36	34
CV-D_6	1	378	362.00	8.77	111.12	35
LMG-D_5	1	336	239.50	12.65	97.00	28
LCV-D_6	1	380	364.00	8.77	93.00	34

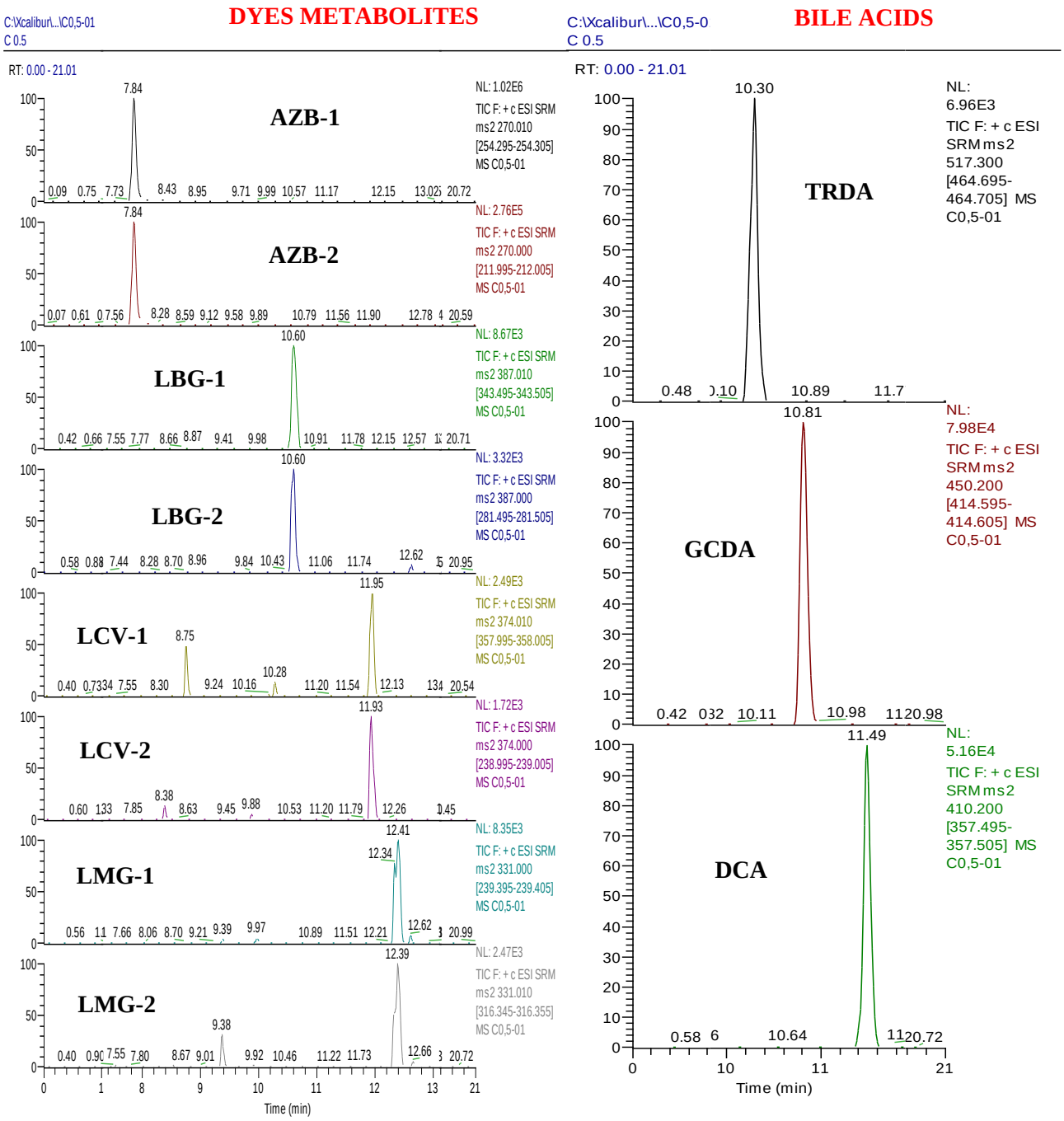
Annexe 3 : Chromatogramme LC-MS/MS des colorants et de marqueurs supplémentés à 0.5 µg.kg^{-1} excepté PPRA, NMB à 5 µg.kg^{-1}, AZB, NBA, et les acides biliaires à 50 µg.kg^{-1} et les standards internes à 40 µg.kg^{-1} dans le tissu de truite.




C:\Xcalibur\...\SE0,5-01
SE 0.5
DYE
RT: 0.00 - 21.00
RHB-1
NL: 3.41E4
TIC F: + c ESI SRM
ms2 443.040
[399.495-399.505]
MS SE0,5-01
RHB-2
NL: 2.29E4
TIC F: + c ESI SRM
ms2 443.010
[355.495-355.505]
MS SE0,5-01
RHG-1
NL: 5.10E3
TIC F: + c ESI SRM
ms2 443.020
[386.495-386.505]
MS SE0,5-01
RHG-2
NL: 1.10E4
TIC F: + c ESI SRM
ms2 443.000
[341.395-341.405]
MS SE0,5-01
VBB-1
NL: 3.19E3
TIC F: + c ESI SRM
ms2 470.020
[333.395-333.405]
MS SE0,5-01
VBB-2
NL: 1.70E3
TIC F: + c ESI SRM
ms2 470.000
[348.995-349.005]
MS SE0,5-01
VBR-1
NL: 3.78E3
TIC F: + c ESI SRM
ms2 422.020
[257.295-257.305]
MS SE0,5-01
VBR-2
NL: 7.06E2
TIC F: + c ESI SRM
ms2 422.000
[392.995-393.005]
MS SE0,5-01


C:\Xcalibur\...\SE0,5-01
SE 0.5
DYE
RT: 0.00 - 21.00
VPBO-1
NL: 2.75E4
TIC F: + c ESI SRM
ms2 478.010
[434.595-434.605]
MS SE0,5-01
VPBO-2
NL: 9.96E3
TIC F: + c ESI SRM
ms2 478.000
[390.495-390.505]
MS SE0,5-01


C:\Xcalibur\...\SE0,5-01
SE 0.5
INTERNAL
C:\Xcalibur\...\DLVP
DLVPBO SRM 3 tra
DYES METABOLITES
RT: 0.00 - 21.00
RT: 0.00 - 20.99
CV-D6
NL: 4.78E4 TIC F: + c ESI SRM ms2 378.000 [361.995-362.005] MS SE0,5-01
LCV-D6
NL: 3.12E3 TIC F: + c ESI SRM ms2 380.300 [364.595-364.605] MS SE0,5-01
LMG-D5
NL: 1.64E4 TIC F: + c ESI SRM ms2 336.400 [239.495-239.505] MS SE0,5-01
MG-D5
NL: 3.52E4 TIC F: + c ESI SRM ms2 334.000 [318.495-318.505] MS SE0,5-01
DLVPBO
NL: 4.14E4 TIC F: + c ESI SRM ms2 452.310 [303.295-303.305] MS DLVPBO-SRM-07
DLVPBO
NL: 2.55E4 TIC F: + c ESI SRM ms2 452.300 [423.295-423.305] MS DLVPBO-SRM-07
DLVPBO
NL: 2.27E4 TIC F: + c ESI SRM ms2 452.320 [379.195-379.205] MS DLVPBO-SRM-07
Time (min)
Time (min)


DYES METABOLITES
BILE ACIDS
C:\Xcalibur\...\C0,5-01
C 0.5
RT: 0.00 - 21.01
AZB-1
AZB-2
LBG-1
LBG-2
LCV-1
LCV-2
LMG-1
LMG-2
TRDA
GCDA
DCA
Time (min)

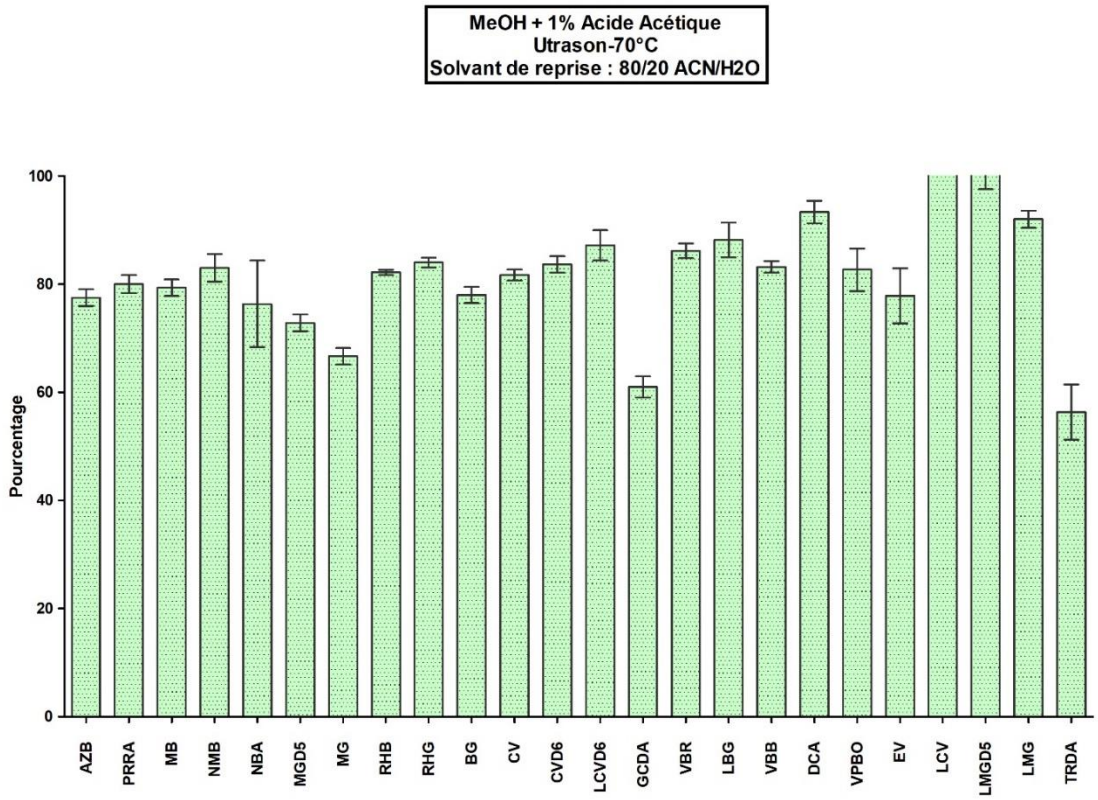
Annexe 4 : Comparaison des intensités de pics suivant le solvant de reprise utilisés.

	Extraction 15ACN/Eau (80:20)	Extraction 19 ACN/ Acide Ascorbique 1g/L	Extraction 20 ACN/ Phase A / Acide Ascorbique 1g/L (70:30:5)	Extraction 21 MeOH/ Phase A / Acide Ascorbique 1g/L (70:30:5)
AZB	6,25E+05	1,04E+05	5,21E+05	6,65E+05
PRRA	1,47E+06	2,60E+05	1,42E+06	1,43E+06
MB	1,38E+06	1,31E+05	9,58E+05	1,24E+06
NMB	5,20E+05	9,72E+04	4,18E+05	4,41E+05
NBA	5,13E+04	8,26E+03	6,09E+04	5,82E+04
MGD5	6,30E+05	1,45E+05	4,30E+05	3,64E+05
MG	1,19E+06	3,59E+05	1,06E+06	8,60E+05
RHB	3,09E+06	7,98E+05	2,71E+06	2,29E+06
RHG	1,49E+06	2,25E+05	1,12E+06	9,03E+05
BG	2,85E+06	7,25E+05	1,97E+06	1,70E+06
CV	5,11E+06	1,14E+06	3,75E+06	3,30E+06
CVD6	4,62E+06	6,61E+05	2,02E+06	1,71E+06
LCVD6	8,32E+04	2,70E+04	7,97E+04	7,51E+04
TRDA	7,02E+02	2,27E+02	4,37E+03	5,07E+03
GCDA	4,50E+04	3,02E+03	2,96E+04	3,48E+04
VBR	7,07E+05	1,12E+05	3,70E+05	2,96E+05
LBG	3,29E+05	1,21E+05	1,35E+05	9,36E+04
VBB	8,16E+05	1,67E+05	4,79E+05	4,10E+05
DCA	6,48E+04	2,10E+04	5,30E+04	3,82E+04
VPBO	8,31E+05	1,92E+05	4,98E+05	3,49E+05
EV	1,15E+06	2,16E+05	5,32E+05	3,72E+05
LCV	1,96E+05	5,92E+04	8,98E+04	8,22E+04
LMGD5	2,38E+05	1,48E+05	9,88E+04	6,14E+04
LMG	2,85E+05	2,81E+05	2,25E+05	1,22E+05

Annexe 5: Gammes de concentrations appliquées

Molécules	Point 1	Point 2	Point 3	Point 4	Point 5
MGD5	40 ppb	40 ppb	40 ppb	40 ppb	40 ppb
LMGD5	40 ppb	40 ppb	40 ppb	40 ppb	40 ppb
LCVD6	40 ppb	40 ppb	40 ppb	40 ppb	40 ppb
CVD6	40 ppb	40 ppb	40 ppb	40 ppb	40 ppb
CV	0 ppb	0,5 ppb	1 ppb	1,5 ppb	2 ppb
PRRA	0 ppb	5 ppb	10 ppb	15 ppb	20 ppb
RHB	0 ppb	0,5 ppb	1 ppb	1,5 ppb	2 ppb
RHG	0 ppb	0,5 ppb	1 ppb	1,5 ppb	2 ppb
BG	0 ppb	0,5 ppb	1 ppb	1,5 ppb	2 ppb
MG	0 ppb	0,5 ppb	1 ppb	1,5 ppb	2 ppb
VBB	0 ppb	0,5 ppb	1 ppb	1,5 ppb	2 ppb
VBR	0 ppb	0,5 ppb	1 ppb	1,5 ppb	2 ppb
EV	0 ppb	0,5 ppb	1 ppb	1,5 ppb	2 ppb
LBG	0 ppb	0,5 ppb	1 ppb	1,5 ppb	2 ppb
LMG	0 ppb	0,5 ppb	1 ppb	1,5 ppb	2 ppb
NMB	0 ppb	5 ppb	10 ppb	15 ppb	20 ppb
VPBO	0 ppb	0,5 ppb	1 ppb	1,5 ppb	2 ppb
LCV	0 ppb	0,5 ppb	1 ppb	1,5 ppb	2 ppb
NBA	0 ppb	50 ppb	100 ppb	150 ppb	200 ppb
AZB	0 ppb	50 ppb	100 ppb	150 ppb	200 ppb
MB	0 ppb	0,5 ppb	1 ppb	1,5 ppb	2 ppb
DCA	0 ppb	50 ppb	100 ppb	150 ppb	200 ppb
GCDA	0 ppb	50 ppb	100 ppb	150 ppb	200 ppb
TRDA	0 ppb	50 ppb	100 ppb	150 ppb	200 ppb

Annexe 6: Rendements de colorants obtenus par chauffage à 70°C aux ultrasons.



Annexe 7: Supplementary data Article 1

Table S1. Transitions followed and their corresponding collision energies (CE) for quantification and confirmation purposes in the triple quadrupole analyzer.

Family	Compound	Abbreviation	t_R (min)	DP	Quantification			Confirmation			Ion ratio %
					Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	CE (eV)	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	CE (eV)	
Triarymethanes	Malachite green	MG	4.6	80	329	313	49	329	208	47	-0.7
	Brilliant green	BG	6.1	21	385	341	51	385	297	67	1.0
	Crystal violet	CV	5.5	14	372	356	53	372	340	73	1.1
	Ethyl violet	EV	7.6	30	456	412	57	456	368	77	-2.3
	Pararosaline	PRRA	2.7	41	288	195	43	288	178	57	-0.5
Triarylmethanes derivatives	Victoria blue B	VBB	6.3	40	470	454	61	470	349	49	-0.9
	Victoria blue R	VBR	5.9	81	422	406	55	422	393	51	-0.6
	Victoria pure blue bo	VPBO	7.3	41	478	434	59	478	390	77	5.2
Phenothiazines	Methylene blue	MB	2.6	56	284	268	47	284	252	69	-3.0
	Azure B	AZB	2.4	52	270	254	45	270	212	65	1.9
	New methylene blue	NMB	3.8	61	312	283	41	312	254	51	0.9
Phenoxazines	Nile blue A	NBA	4.1	31	318	274	71	318	217	85	-0.7
Rhodamines	Rhodamine 6G	RHG	5.3	31	443	415	47	443	341	61	-3.0
	Rhodamine B	RHB	5.0	50	443	399	57	443	355	77	-1.0
Internal standard	Crystal violet-d_6	CV-d_6	5.6	46	378	362	55				

t_R= retention time; DP= declustering potential; CE= collision energy

Table S2. Parameter settings used for metabolomics data processing

Step	Method	Parameters	Values
Peak detection (*Peakpicking*)[a]	centWave	ppm	10
		mzabs	0.01
		mzdiff	0.01
		prefilter	3, 30000
		snthresh	6
		peakwidth	5,35
		noise	15000
Peak grouping (*group*) [a]	density	bw	10
		mzwid	0.01
		minfrac	0.33
		minsamp	4
Normalization (Batch_correction)[b]	lowess	span	0.85

[a] data processed with xcms R-package
[b] data processed on Galaxy workflow4metabolomics version (2.0.3)

Fig. S1. PLS-DA score plot of metabolites profiles from samples belonging to control and treated (MG and VPBO) trout for plasma

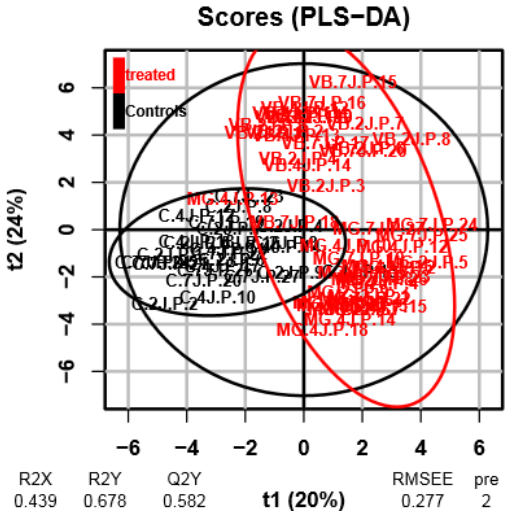
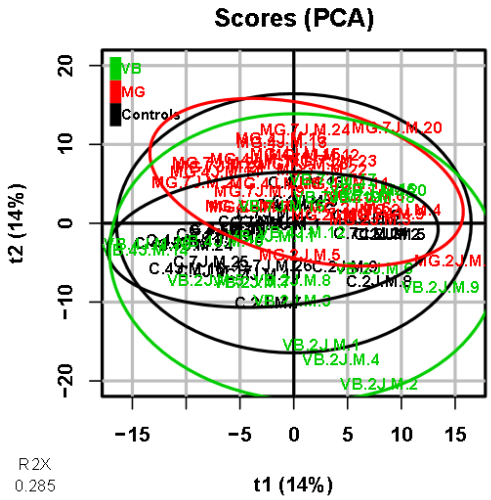


Fig. S2. PCA score plots for filtered data matrix constructed from samples belonging to control and treated (MG and VPBO) trout, for muscle (a) and for liver (b)

a)



b)

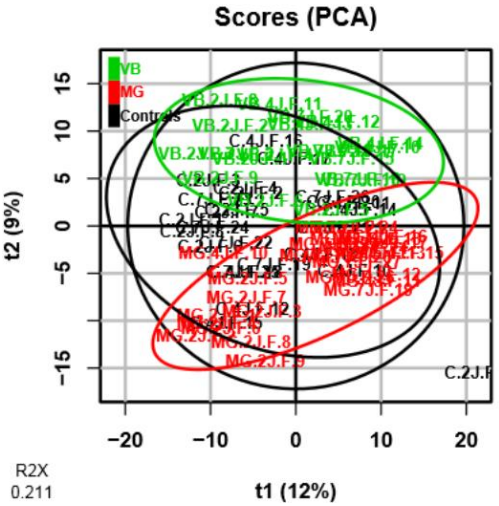
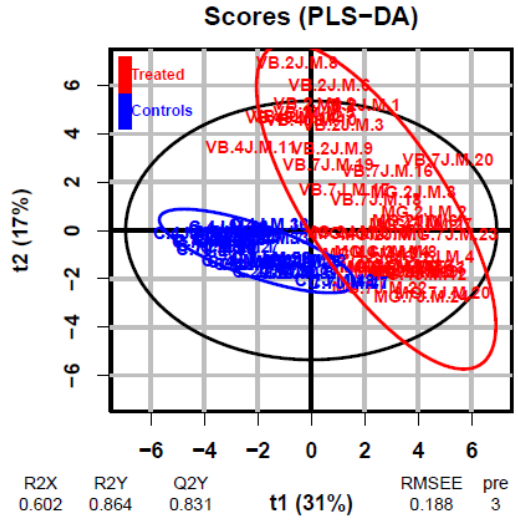


Fig. S3. PLS-DA score plot of selected features potentially biomarkers, constructed from samples belonging to control and treated (MG and VPBO) trout, for muscle (a) and for liver (b)

a)



b)

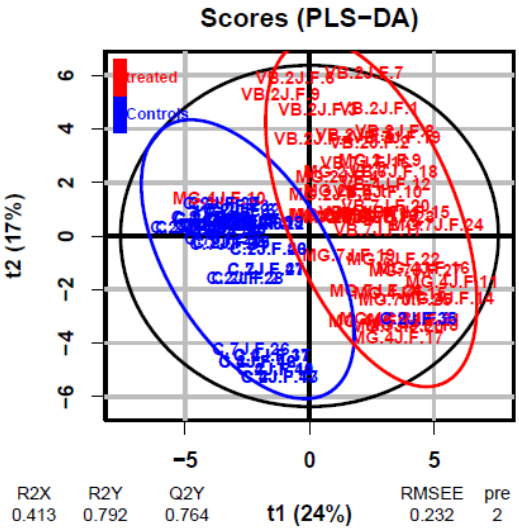
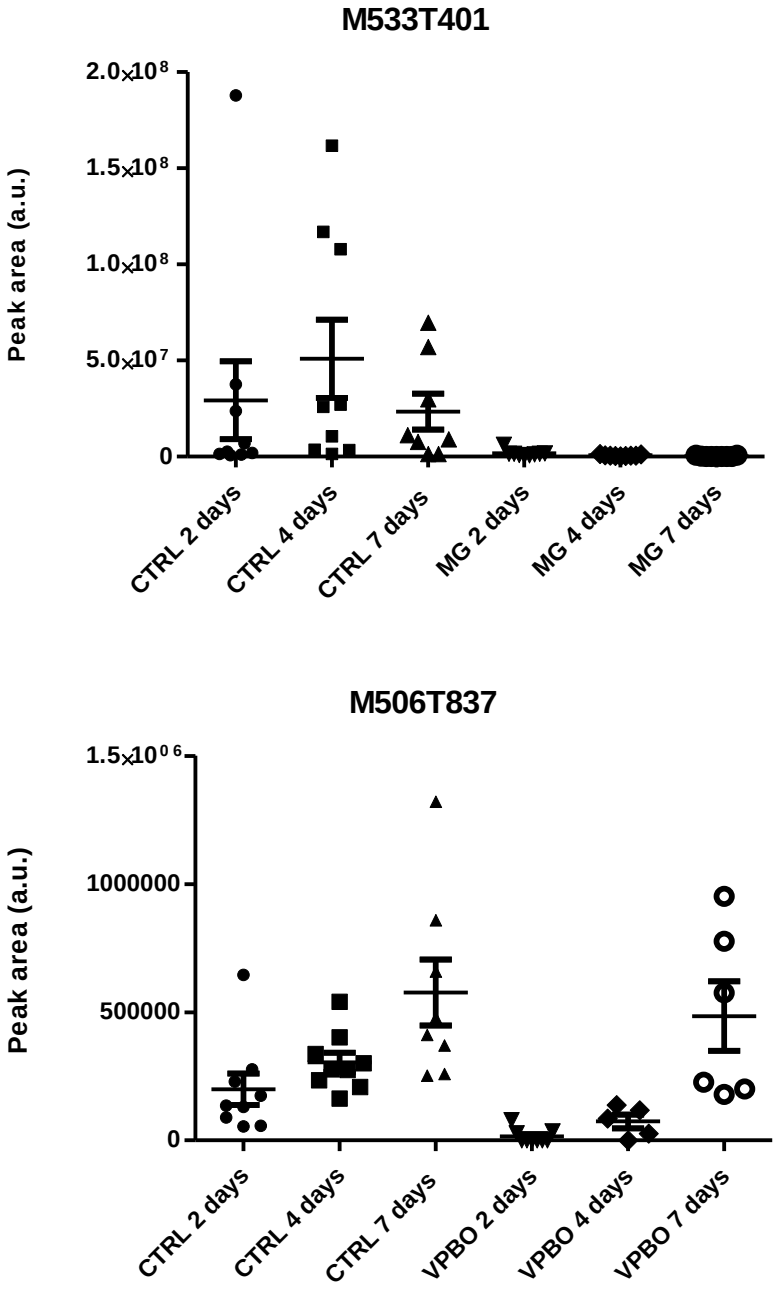


Fig. S4. Surface time profile of some potential biomarkers during treatment and after end of treatment in muscle (for MG: M533T401; for VPBO: M506T837) and in liver (for VPBO: M449T545; for MG and VPBO: M717T533)



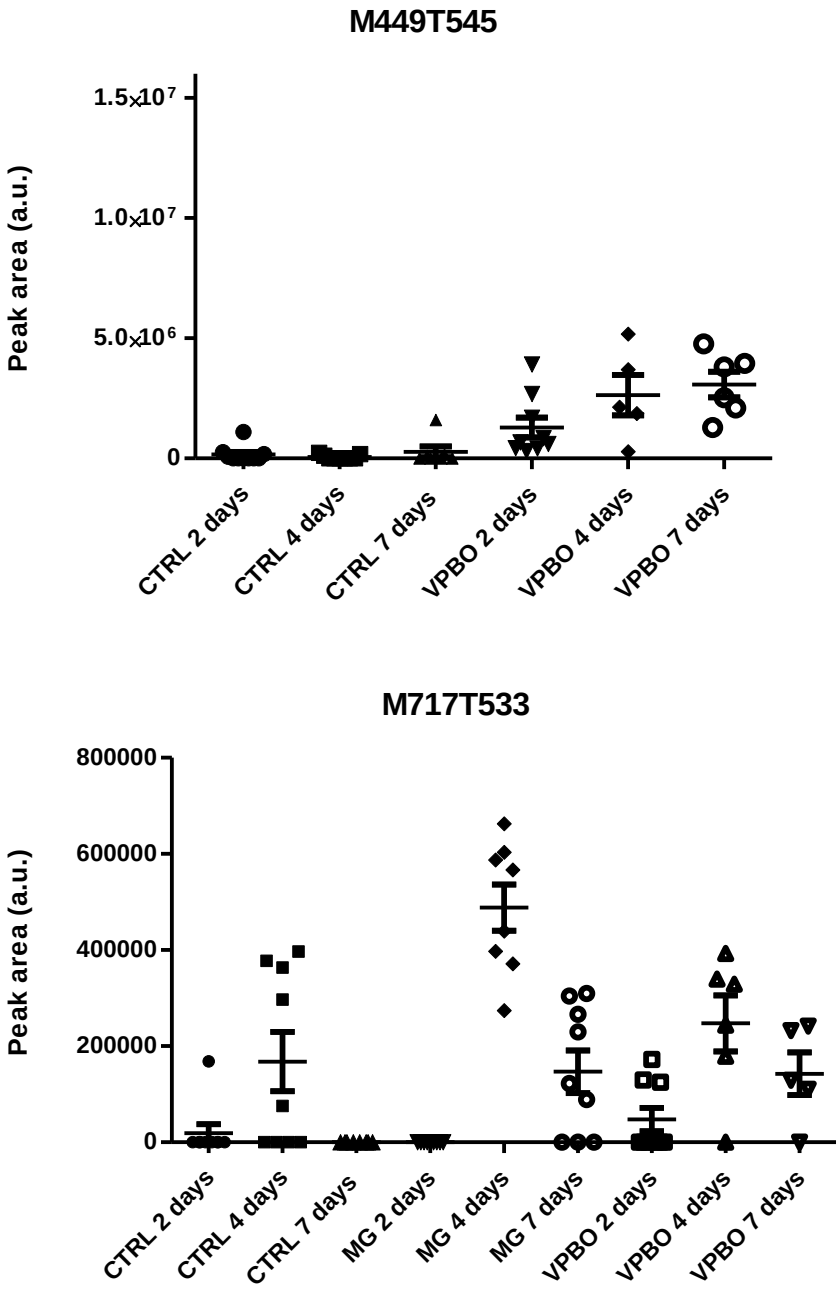
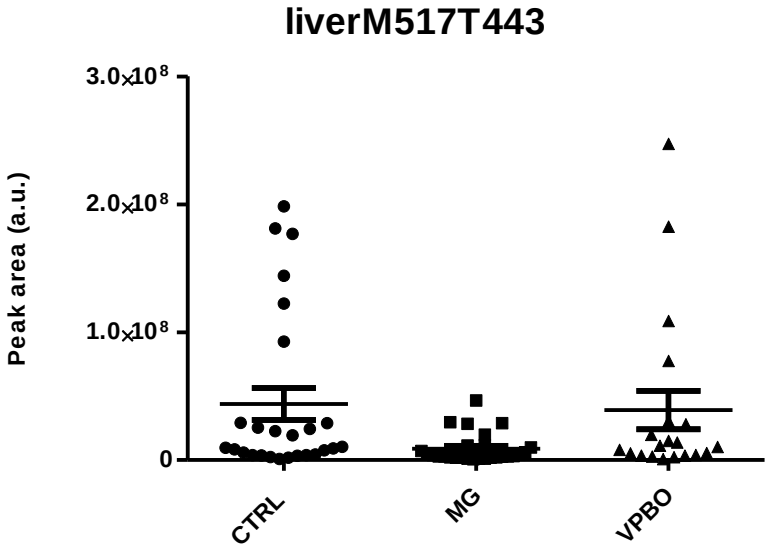

M449T545
Peak area (a.u.)
1.5x10⁷
1.0x10⁷
5.0x10⁶
0
CTRL 2 days
CTRL 4 days
CTRL 7 days
VPBO 2 days
VPBO 4 days
VPBO 7 days
M717T533
Peak area (a.u.)
800000
600000
400000
200000
0
CTRL 2 days
CTRL 4 days
CTRL 7 days
MG 2 days
MG 4 days
MG 7 days
VPBO 2 days
VPBO 4 days
VPBO 7 days

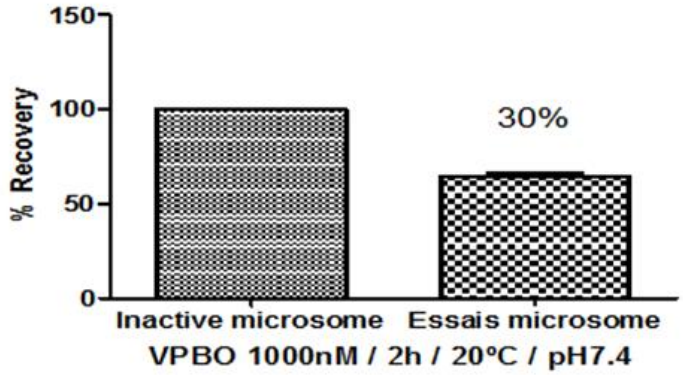
Fig. S5. Surface profile of potential biomarker M517T443, suggested as Taurodeoxycholic acid, in liver between treated trout and control trout



Annexe 8: Supplementary data Article 2

Supplementary Table 1. In vitro LC-Orbitrap-HRMS data of MG and their metabolites in trout

Biotranformation	Molecular Formula	Calculated mass	Measured mass	Error (ppm)	RT (min)	Intensity [cps] Microsomes	Intensity [cps] Induced S9
MG	**$C_{23}H_{25}N_2$**	**329.2012**	329.2004		5.4	31696634	27924935
N-demethylation	$C_{22}H_{23}N_2$	315,18558	315.1549		5.2	922210	4845232
double N-demethylation	$C_{21}H_{21}N_2$	301,16993	301.1695			/	1185579
triple N-demethylation	$C_{20}H_{19}N_2$	287,15428	287.1542			/	264086
quadruple N-demethylation	$C_{19}H_{17}N_2$	273,13863	/			/	/
Double bound reduction	$C_{23}H_{27}N_2$	331,21688	331.2160		9.6	11143112	10811583
Double bound reduction + demethylation	$C_{22}H_{25}N_2$	317,20123	317.2006		8.3	266050	2037503
Double bound reduction + double demethylation	$C_{21}H_{23}N_2$	303,18558	303.1855			/	437420



Supplementary Fig.1 Decrease of VPBO after incubation with microsomes.

Annexe 9: Supplementary data Article 3

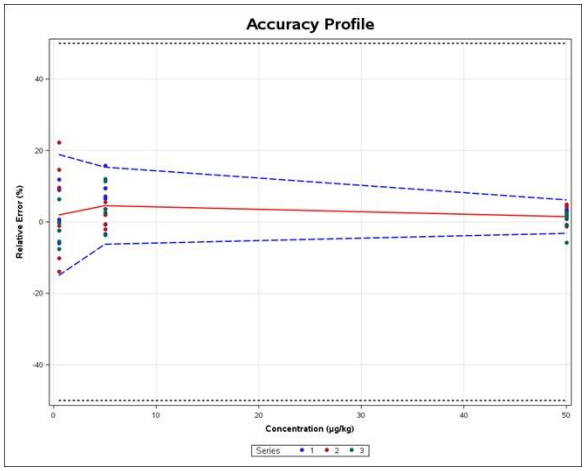
Table S1. Detailed results of method validation for all matrices (muscle, plasma, skin, and liver)

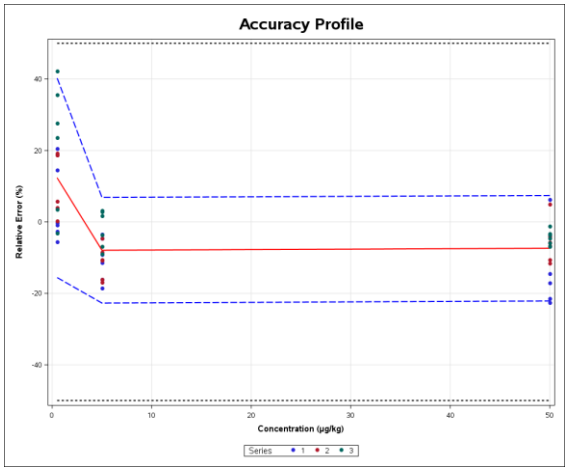
Mean introduced concentration	Trueness		Precision		Accuracy	
µg.L^{-1} (plasma) or µg.kg^{-1}	Absolute bias (µg.L^{-1} or µg.kg^{-1})	Recovery (%)	Repeatability (RSD%)	Intermediate precision (RSD%)	β-expectation tolerance limit (µg.L^{-1} or µg.kg^{-1})	Risk (%)
Muscle						
0.5	0.01	102.0	9.5	9.4	[0.42, 0.70]	< 0.1
5	0.23	104.5	5.2	5.8	[4.688, 5.767]	< 0.1
50	0.74	101.5	2.4	2.5	[48.40, 53.08]	0
Plasma-skin-liver						
0.5	0.06	112.3	13.0	14.7	[0.42, 0.70]	1.78
5	-0.40	92.1	5.4	7.1	[3.86, 5.34]	< 0.1
50	-3.69	92.6	7.4	8.0	[38.9, 53.7]	< 0.1

Plasma µg.L^{-1}, muscle, skin, liver (µg.kg^{-1}): LOD = 0.15; Lower LOQ = 0.50; RSD = relative standard deviation

Supplementary Figure S1. Accuracy profiles concerning method validation for muscle (a) and plasma, skin, and liver (b).

(a) (b)





Supplementary Table S2. Estimated uncertainties of measurement at each concentration level of the validation samples

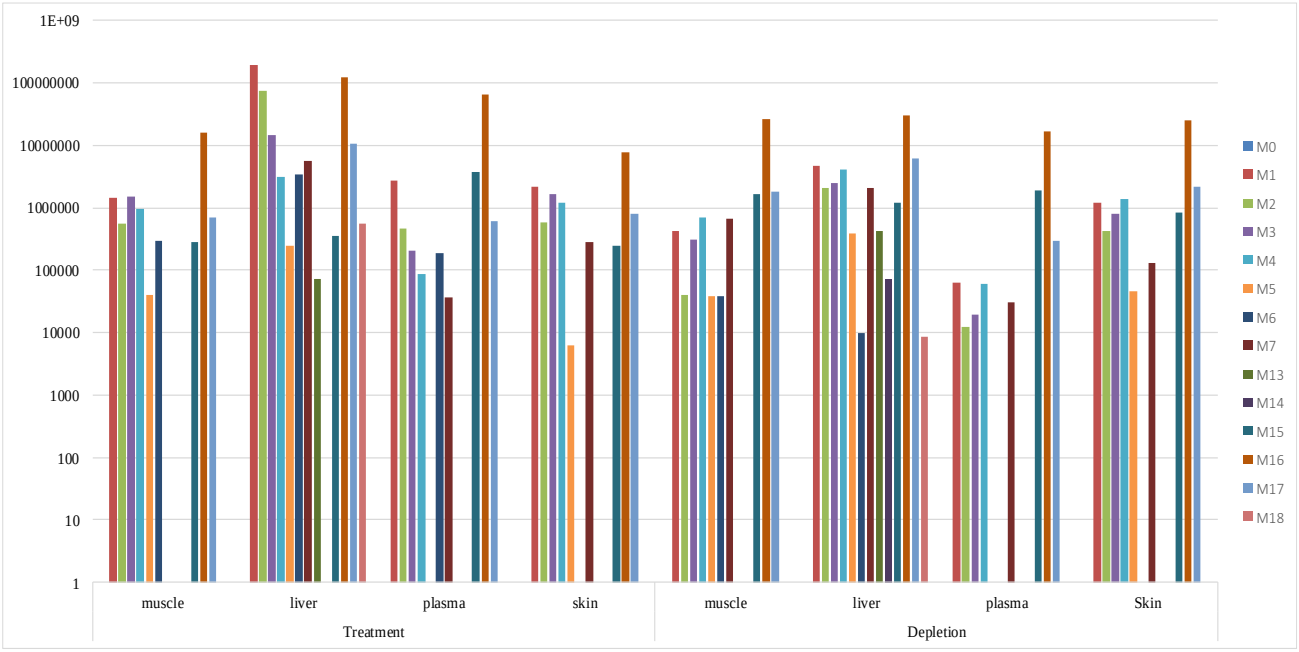
µg.L^{-1} (plasma) or µg.kg^{-1}	Uncertainty of the bias (µg.L^{-1} or µg.kg^{-1})	Uncertainty (µg.L^{-1} or µg.kg^{-1})	Expanded uncertainty (µg.L^{-1} or µg.kg^{-1})	Relative expanded uncertainty (%)
		Muscle		
0.5	0.01114	0.04856	0.09712	19.42
5	0.09414	0.3030	0.6060	12.12
50	0.3837	1.327	2.655	5.309
		Plasma-skin-liver		
0.5	0.02516	0.07782	0.1556	31.13
5	0.1491	0.3858	0.7715	15.43
50	1.219	4.181	8.362	16.72

Supplementary Table S3. Data regression analysis of the standard calibration curves

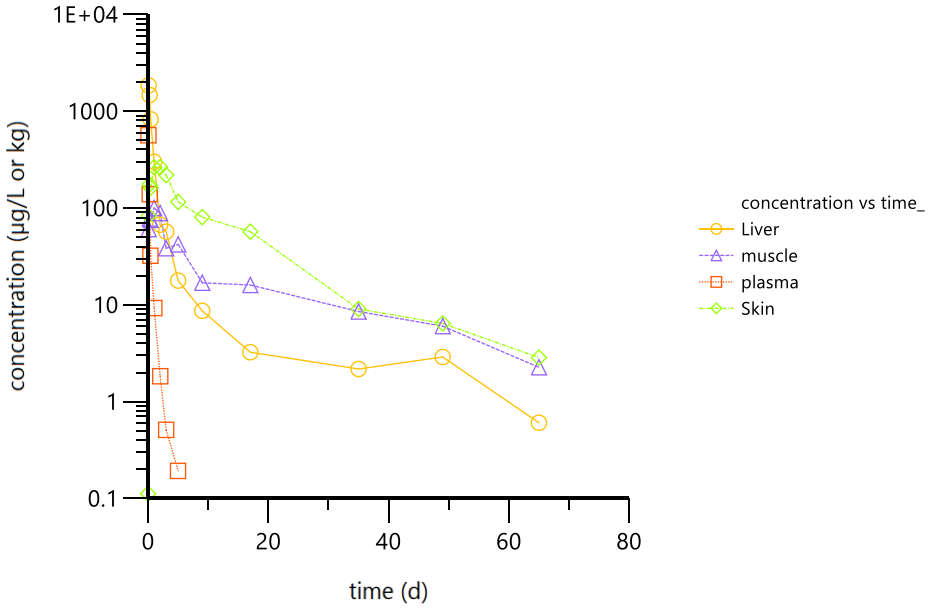
Matrix	Curve	Intercept	Slope	Quadratic term	Weighting	R^2
Muscle	1	-0.05165	0.2692	/	1/X	0.9986
	2	-0.05634	0.2656	/	1/X	0.9996
	3	-0.03846	0.2715	/	1/X	0.9981
			RSD: 1.1%			
Plasma-skin-liver	1	-0.06750	0.3379	7.72e^{-5}	1/X	0.9940
	2	-0.07378	0.3263	42.2e^{-5}	1/X	0.9979
	3	-0.02272	0.2984	89.0e^{-5}	1/X	0.9953
			RSD: 6.3%			

RSD = relative standard deviation

Supplementary Figure S2. Mean peak area of VPBO metabolites detected in muscle, liver, plasma and skin during treatment and during depuration



Supplementary Figure S3. Mean Concentration profile of VBPO in rainbow trout tissues and plasma after water bath for 24 h with VPBO at a dose of 40 mg.kg^{-1} b.w.



Titre : **Résidus marqueurs de colorants dans les poissons d'aquaculture: étude du métabolisme des colorants chez le poisson par des modèles *in vitro* et *in vivo*.**

Mots clés : colorants ● résidus ● biomarqueurs ● métabolisme ● spectrométrie de masse

Résumé : Les colorants de la famille des triarylméthanes sont interdits en aquaculture à cause de leur toxicité. Malgré cela, ils sont toujours utilisés en aquaculture du fait de leurs propriétés antiseptiques et antifongiques, de leurs faibles coûts et de leur disponibilité en tant que produits chimiques pour certaines industries. Afin de protéger les consommateurs, la réglementation européenne impose des contrôles stricts des résidus de substances interdites dans les denrées d'origine animale. En France, pour les colorants à activité pharmacologique, ce contrôle est ciblé sur la présence de résidus de vert de malachite, de cristal violet et de vert brillant dans les produits d'aquaculture, incluant leurs résidus marqueurs métabolisés sous forme de leuco-bases.

Pour anticiper le futur de la surveillance des colorants face à d'éventuelles nouvelles pratiques d'usages, cette thèse a exploré différentes approches reposant sur l'analyse du métabolome par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse à Haute Résolution et des méthodologies *in vitro* et *in vivo*.

Les résultats de ce projet apportent des données i) sur le comportement et le devenir de colorants dans les poissons et ii) sur leurs effets, en vue de proposer des marqueurs de traitement issus de l'endo-métabolome et/ou de le xéno-métabolome. Nous avons pu observer une perturbation biologique sur la production d'acides biliaires après traitement au vert de malachite et au victoria pure blue bo (VPBO). Par ailleurs, un métabolite direct issu du traitement de truites au VPBO, le dééthyl-leuco-VPBO, a été souligné comme un résidu marqueur approprié dans le muscle et la peau de poisson.

Enfin, une méthode analytique de détection étendue à d'autres familles de colorants, et incluant de nouveaux résidus marqueurs de traitement, a été développée par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem.

Title : **Marker residues of dyes in farm fish: study of dye metabolism in fish by *in vitro* and *in vivo* models**

Keywords : dyes ● residues ● biomarkers ● metabolism ● mass spectrometry

Abstract : Dyes from the triarylmethane family are prohibited in aquaculture because of their toxicity. Despite this, they are still used in aquaculture due to their antiseptic and antifungal properties, and to their low costs and availability as chemicals in the industry. In order to protect consumers, European regulations impose strict controls on residues of prohibited substances in food of animal origin. In France, for dyes with pharmacological activity, this control is targeted on the presence of residues of malachite green, crystal violet and brilliant green in aquaculture products, including their marker residues in the form of metabolized leuco-bases.

To anticipate the future of dye monitoring due to possible new practices in fish farming, this thesis explored different approaches based on the analysis of the fish metabolome by liquid chromatography coupled with High Resolution mass spectrometry and *in vitro* or *in vivo* methodologies.

The results of this project provide data i) on the behaviour and fate of dyes in fish and ii) on their effects, with a view to proposing markers of treatments extracted from the endometabolome and / or the xenometabolome. We observed a biological disturbance in the production of bile acids after treatments with malachite green and with victoria pure blue bo (VPBO). Moreover, a direct metabolite resulting from the treatment of trout with VPBO, ie. deethyl-leuco-VPBO, has been highlighted as an appropriate marker residue in fish muscle and skin.

Finally, an analytical method extended to several other families of dyes has been developed by means of liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry, and including the new marker residues of treatment.