



**COMITE SCIENTIFIQUE
DE L'AGENCE FEDERALE POUR LA SECURITE
DE LA CHAINE ALIMENTAIRE**

Avis rapide 12-2011

Concerne: Présence de thiouracil dans un échantillon d'urine de bovin (dossier Sci Com N°2011/26).

Avis rapide approuvé par le Comité scientifique en séance plénière du 14 octobre 2011

Résumé

Suite à un contrôle de routine effectué dans le cadre du plan de contrôle de l'AFSCA, la présence de thiouracil a été détectée dans un échantillon d'urine de bovin à la concentration de 15 ppb. D'autres échantillons prélevés lors de l'enquête complémentaire étaient conformes. Le résultat de la contre analyse de l'échantillon initial d'urine était de 29,7 ppb. L'interprétation de ces résultats non-conformes est discutée en rapport avec les données récentes de la littérature scientifique.

Summary

Advice 12-2011 of the Scientific Committee of the FASFC

Following a routine control in the framework of the control plan of FASFC, the presence of thiouracil was detected in a bovine urine sample at a concentration of 15 ppb. Other samples taken during the further investigation were conform. The result of the counter-analysis of the original sample of urine was 29.7 ppb. The interpretation of these non conform results is discussed in relation to recent data from the scientific literature.

Mots clés

Thyréostatique, Thiouracil, urine, bovin, semi-endogène

1. Termes de référence

Il est demandé au Comité scientifique d'évaluer la pertinence d'un cas isolé de détection de résidus de thiouracil en concentration supérieure à la limite d'action (10 ppb) dans un échantillon d'urine de bovin provenant d'une exploitation agricole de bétail viandeux.

Vu les discussions durant la réunion de groupe de travail du 10 octobre 2011 et la séance plénière du 14 octobre 2011,

le Comité scientifique émet l'avis suivant :

2. Introduction

Lors d'un contrôle de routine effectué dans le cadre du plan de contrôle de l'AFSCA, quatre échantillons de matières fécales et un échantillon d'urine ont été prélevés dans une exploitation agricole de bétail viandeux. Suite à ce contrôle, la présence de thiouracil a été détectée dans un échantillon d'urine de bovin viandeux mâle de 20 mois à une concentration de 15 ppb. Les quatre échantillons de matières fécales prélevés pour la recherche d'autres paramètres étaient conformes.

Les échantillons prélevés dans l'exploitation lors de l'enquête complémentaire, 3 mois plus tard, se sont révélés conformes (10 échantillons de matières fécales et 2 échantillons d'aliments pour animaux). La concentration de thiouracil mesurée lors de la contre analyse dans l'échantillon initial était de 29,7 ppb.

Le 2-thiouracil (N° CAS 141-90-2; figure 1) appartient au groupe des substances thyrostatiques. Le terme médicament thyrostatique est utilisé pour faire référence à un groupe complexe de substances qui perturbent la fonction thyroïdienne, avec comme conséquence une diminution de la production d'hormones triiodothyronine (T3) et thyroxine (T4) (De Brabander 1984; Courtheyn et al., 2002). Le 2-thiouracil est un composé qui a une fonction inhibitrice importante sur la thyroïde (Le Bizec et al., 2011).

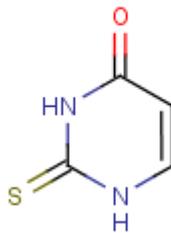


Figure 1: Formule moléculaire¹ du thiouracil

¹

http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/ProxyServlet?objectHandle=Search&actionHandle=getAll3DMapViewFiles&nextPage=jsp%2Fcommon%2FChemFull.jsp%3FcalledFrom%3Dlite&chemid=0000141902&formatType=_3D

Lors de l'emploi de thyrostatiques pour l'engraissement des animaux on obtient un gain de poids lié à une augmentation du volume de remplissage du tractus gastro-intestinal ainsi qu'à une rétention d'eau dans les tissus comestibles, suite à l'inhibition de la production d'hormones thyroïdiennes (Pinel et al., 2006; Vanden Bussche et al., 2011). Ceci conduit à la production de viande de moins bonne qualité (teneur en eau plus élevée). Ce qui constitue une fraude. De plus, les résidus de substances thyrostatiques peuvent être tératogènes et cancérigènes (IARC, 2001). L'IARC (2001) a classé le thiouracil dans le groupe 2B (l'agent est peut-être cancérigène pour l'homme).

L'emploi de médicaments thyrostatiques pour l'engraissement des animaux est interdit en Belgique depuis 1974 (AR du 12.04.1974²). En Europe, les substances thyrostatiques ont été interdites pour usage comme médicament vétérinaire chez les animaux de rente depuis 1981 en raison de leurs propriétés cancérigènes et tératogènes (Directive 81/602/CE³).

La détection occasionnelle de thiouracil dans les urines de bovins dans le cadre du monitoring national, à des niveaux de 1 à 10 µg/L, a soulevé la question de l'origine de la substance (Pinel et al., 2006; Vanden Bussche et al., 2009). L'hypothèse de la contribution des aliments pour animaux a été considérée par Pinel et al. (2006) étant donné que certains végétaux de la famille des crucifères sont connus pour contenir des substances appelées, goitrogènes, qui peuvent diminuer l'absorption d'iode par la thyroïde et la conversion de thyroxine (T4) en triiodothyronine (T3). Ainsi, Pinel et al. (2006) ont étudié l'influence d'une alimentation à base de crucifères sur l'occurrence de résidus de thiouracil dans l'urine de bovins adultes. Des concentrations en thiouracil de 3-7 et 2-9 µg/L ont été respectivement mesurées dans l'urine collectée après consommation de choux et de colza. Pinel et al. (2006) ont démontré par cette étude que l'excrétion urinaire de thiouracil chez les bovins adultes ayant ingérés des crucifères pourrait laisser croire à tort à l'utilisation illégale de thyrostatiques.

Les laboratoires de références de l'Union Européenne (European Union Reference Laboratories – EURLs, anciennement CRL's pour Community Reference Laboratories) (EURL, 2007) recommandent une concentration maximale de 10 ppb pour le thiouracil, et les autres thyrostatiques dans les urines et la thyroïde comme limite de performance minimale requise (MRPL). Cette valeur maximale de 10 ppb tient compte de la présence possible de thiouracil détecté chez des bovins ayant consommés des plantes crucifères. Cette limite d'action sert de ligne de conduite technique pour le développement de méthodes analytiques pour le contrôle des résidus. Actuellement, la spectrométrie de masse couplée à la chromatographie en phase liquide est la méthode de choix pour l'identification et la quantification des substances thyrostatiques.

En 2006, le LABERCA a analysé 1098 échantillons d'urines de bovins en France en vue de détecter la présence éventuelle de thiouracil (Le Bizec et al., 2011). Cette molécule n'a pas été détectée dans 32% des échantillons. Dans les autres échantillons, les concentrations variaient entre la limite de décision et 22,5 µg/L. Les valeurs moyennes et médianes étaient de 1,4 et 0,3 µg/L, et la distribution des résultats ne suivait pas la loi normale. La concentration au 95^{ème} et au 99^{ème} percentile étaient de 6,2 µg/L et 12,1 µg/L, respectivement. Les concentrations en thiouracil mesurées chez les veaux (< 6 mois) étaient plus élevées que chez les bovins adultes. Les concentrations en thiouracil mesurées chez les bovins femelles étaient plus élevées que chez les bovins mâles.

L'étude de Le Bizec souligne le besoin urgent pour un critère de confirmation, basé sur la découverte d'un biomarqueur discriminant ou la mesure d'un rapport isotopique. Vanden Bussche et al. (2011) mentionnent que des recherches sont nécessaires pour investiguer les voies de formation du thiouracil et identifier les précurseurs éventuels.

² Arrêté royal relatif à certaines opérations concernant les substances à action hormonale, antihormonale, anabolisante, bêta-adrénergique, anti-infectieuse, antiparasitaire et anti-inflammatoire

³ Off. J. Eur. Communities 1981, L 222, 32-33.

3. Avis

Le Comité scientifique constate que, dans le cas décrit, la concentration en thiouracil recommandée de 10 ppb (utilisée comme limite d'action) a été dépassée dans l'urine d'un seul animal d'une exploitation bovine (constaté lors de deux mesures indépendantes d'un même échantillon d'urine).

Des cas similaires de détection de thiouracil dans les urines de bovins à des concentrations inférieures à 100 ppb ont été rapportés dans d'autres pays de l'Union Européenne (Danemark, France, Royaume-Uni, Irlande, Luxembourg, Pologne et Estonie). Il ressort des résultats des contrôles effectués dans le cadre de la Directive 96/23/CE et rapportés à la Commission Européenne en 2009, que parmi les 10.013 échantillons analysés dans le groupe A2 (agents antithyroïdiens), 46 échantillons étaient non conformes (0,46%), tous pour la présence de thiouracil. Six états membres (Danemark, France, Royaume-Uni, Irlande, Luxembourg et Pologne) ont rapporté 29 résultats non conformes pour la présence de thiouracil chez les bovins. Des concentrations jusque 87,4 µg/kg ont été mesurées. Les investigations menées par les autorités nationales n'ont pas donné d'indication d'un usage illégal du thiouracil. La présence de thiouracil dans l'urine des bovins, en faibles concentrations pourrait être due à la consommation par les animaux de plantes crucifères (European Commission, 2009; EFSA, 2011).

En 2008, le thiouracil était également la seule substance du groupe des agents antithyroïdiens pour lequel des résultats non conformes ont été rapportés pour des échantillons ciblés de bovins, porcs, moutons et chèvres. Les niveaux étaient inférieurs à 10 ppb et résultaient également, plus que probablement de la présence de plantes crucifères dans les aliments pour animaux (EFSA, 2010).

Une MRPL (Minimal Required Performance Limit) de 100 ppb était d'application pour les substances thyrostatiques. Cette valeur de 100 ppb tenait compte de la sensibilité (limite de détection) des méthodes analytiques de l'époque et du fait que les concentrations en thyrostatiques nécessaires pour observer un gain de poids chez l'animal génèrent des concentrations en thiouracil dans les urines largement supérieures à 100 µg/L (Pinel et al., 2006).

L'amélioration des performances analytiques a conduit les EURLs à proposer une valeur de 10 ppb (EURL, 2007). Cette valeur tient compte de l'étude de Pinel et al. (2006) dans laquelle des concentrations jusque 9 µg/L dans les urines de bovins ayant consommés des crucifères ont été mesurées.

Le Bizec et al. (2011) proposent des valeurs seuils de 5,7 et 9,1 µg/L pour les bovins adultes mâles (6-24 mois) au niveau de confiance de 95 et 99% respectivement pour différencier les échantillons conformes des échantillons d'urines suspects.

Selon l'histogramme présenté dans l'étude de Le Bizec et al. (2011), le pic de détection du thiouracil serait autour de 4-5 ppb, des valeurs de 12-15 ppb et jusque 22,5 ppb sont également mesurées.

Le Comité scientifique pense qu'il faut être prudent avec les valeurs proposées par Le Bizec et al. (2011) pour les extrapoler à la situation en Belgique. En effet, de nombreux facteurs tels que l'âge, le sexe, la composition de l'alimentation, l'état physiologique, la conservation des échantillons, la méthode d'analyse, etc.; pourraient générer de la variabilité dans les résultats. De plus, les résultats de thiouracil dans l'étude de Le Bizec et al. (2011) ne suivent pas une distribution normale.

Le problème qui se pose est l'application de la limite d'action de 10 ppb sur le terrain. Cette valeur a été établie sur base de considérations analytiques et tient compte des résultats d'une étude (Pinel et al., 2006). Les concentrations en thiouracil retrouvées dans l'urine du bovin incriminé seraient trop faibles pour correspondre à une administration efficace en termes d'effet promoteur de croissance.

Le Bizec et al. (2011) soulignent que la robustesse de la méthode pour la quantification du thiouracil et le contrôle de l'instabilité de tels résidus sont deux problèmes clés à résoudre

avant l'implémentation efficace et non ambiguë de limites d'action. Le fait de congeler et décongeler la même urine peut parfois être à l'origine d'une diminution de la quantité de thiouracil retrouvée.

Le résultat de la contre analyse de l'échantillon d'urine (29,7 ppb) est deux fois plus élevé que le résultat de la première analyse (15 ppb). Les deux analyses ont été effectuées dans des laboratoires différents avec des méthodes d'analyses différentes. La première analyse a été effectuée par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse (LC-MS) avec dérivatisation. La contre-analyse a été effectuée par chromatographie liquide ultra haute performance couplée à un spectromètre de masse en tandem (UHPLC-MS) sans dérivatisation. Il n'existe pas de standard interne pour la thiouracil (analogue de thiouracil deutéré) mais du propyl-thiouracil est utilisé comme standard interne (Vanden Bussche et al., 2010). Les incertitudes de mesures n'ont pas été données.

Les résidus de thiouracil dans les échantillons d'urines ne sont pas stables à température ambiante ou après congélation (Vanden Bussche, 2011). Le résultat de la contre analyse est cependant plus élevé que le résultat de la première analyse.

Le Comité scientifique ne peut expliquer l'écart entre les deux résultats. Une hypothèse émise pour expliquer ces différences est l'interaction du thiouracil avec les protéines.

Concernant l'effet de l'alimentation, le taux de glucosinolates est variable suivant le type de tourteaux de colza. Les concentrations en glucosinolates dans des cultivars pauvres en glucosinolates sont de 10,3 µg/mole pour *B. napus tower* et de 11,3 µg/mole pour *B. Campestris Candle* (Bell, 1984). Les concentrations en glucosinolates dans les cultivars à teneurs élevés sont de 105,4 µg/mol pour *B napus target* et 36.2 µg/mole pour *B. napus Turret*. Ces concentrations ont été déterminées sans ajout de myrosinase (Bell, 1984). Le taux de glucosinolates influence la concentration en thiouracil retrouvée dans les urines après consommation de tourteaux de colza.

La purification, l'extraction et l'analyse de tourteaux de colza suivant la méthode de Pinel et al. (2005) ne permet pas la détection de thiouracil. Par contre, l'incorporation d'une étape d'hydrolyse enzymatique catalysée par la myrosinase permet la détection et l'identification de thiouracil dans les tourteaux de colza et autres brassicassés (Vanden Bussche et al., 2011).

D'après Vanden Bussche et al. (2011), les brassicassées ne sont probablement pas la seule source de contamination et d'autres facteurs inconnus pourraient contribuer à la présence naturelle de thiouracil dans les échantillons d'urines.

4. Conclusions

Le Comité scientifique constate que, dans le cas décrit, la limite d'action de 10 ppb est dépassée dans un échantillon d'urine d'un seul animal au sein d'une exploitation bovine (résultat de deux analyses indépendantes). Des cas similaires ont été décrits dans d'autres états membres de l'Union Européenne qui ont été attribués à la présence de crucifères dans l'alimentation de bovins sans davantage de détails.

Le Comité scientifique ne dispose pas d'informations suffisantes pour examiner à fond le cas concret. Cependant, des concentrations en thiouracil de 15 et 29,7 ppb dans l'urine d'un bovin pourraient être liées à plusieurs facteurs.

Les concentrations en thiouracil retrouvées dans l'urine seraient trop faibles pour correspondre à un traitement efficace en terme d'effet promoteur de croissance. Des concentrations en thiouracil dans les urines de 100 ppb et plus indiquent un usage illégal de thiouracil (Pinel et al., 2006).

5. Recommandations

Le Comité scientifique recommande pour les résultats d'analyses supérieurs à 10 ppb d'indiquer que le résultat est non conforme et suggère de réaliser une enquête approfondie au niveau des autres animaux (prélèvement d'échantillons d'urine) et de l'alimentation dans l'exploitation. Pour les résultats d'analyses supérieurs à 100 ppb, on doit considérer que l'animal a été traité de manière illégale.

Le Comité scientifique recommande d'effectuer une étude rétrospective des résultats d'analyse de thiouracil en Belgique et de comparer ces résultats avec l'étude de Le Bizec et al. (2011).

Le Comité scientifique recommande de collecter des données sur les concentrations en thiouracil dans les urines d'animaux de rente en Belgique et de réaliser une étude des facteurs de risque pouvant influencer la présence de thiouracil dans les urines.

Le Comité scientifique recommande la mise en place d'un ring test quantitatif pour les substances thyrostatiques (ce qui suppose la mise à disposition des laboratoires d'un standard marqué par un isotope lourd du carbone, C13).

Le Comité scientifique recommande le développement de recherches de biomarqueurs discriminants ou de la mesure de rapports isotopiques pour mettre en évidence l'utilisation de thiouracil.

Pour le Comité scientifique,

Prof. Dr. Ir. André Huyghebaert.
Président

Bruxelles, le 25/11/2011

Références

Bell. 1984. Nutrients and Toxicants in Rapeseed Meal: a Review. *J ANIM SCI* 1984, 58:996-1010.

Courtheyn D, Le Bizec B, Brambilla G, De Brabander HF, Cobbaert E, de Wiele AV, Vercammen J, De Wasch K. 2002. Recent developments in the use and abuse of growth promoters. *Anal Chim Acta*. 473:71–82.

De Brabander HF. 1984. Bepalingsmethoden voor thyreostatica in biologisch materiaal [thesis]. [Ghent]: Ghent University.

EFSA (European Food Safety Authority), 2010. Report for 2008 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in food of animal origin in the Member States. *EFSA Journal* 2010; 8(4):1559 [55 pp.]. doi:10.2903/j.efsa.2010.1559. Available online: www.efsa.europa.eu

EFSA (European Food Safety Authority), 2011. Report for 2009 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products. Supporting Publications 2011:158. [70 pp.]. Available online: www.efsa.europa.eu.

European Commission (EC), 2010. European Commission Staff Working Document on the implementation of National Residue Monitoring Plans in the Member States in 2009. Available from http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/workdoc_2009_en.pdf

European Union of Reference Laboratory (EURL) 2007. EURL guidance document: EURL's view on state of the art analytical methods for national residue control plans. Available from: <http://www.rivm.nl/bibliotheek/digitaaldepot/crlguidance2007.pdf>.

IARC, 2001. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Some Thyrotropic Agents Volume 79. 763 pages

Le Bizec B., Bichon E., Deceuninck Y. Prévost S., Monteau F., Antignac J-P., Dervilly-Pinel G. 2011. Toward a criterion for suspect thiouracil administration in animal husbandry. *Food additives and Contaminants*, Vol. 28. N° 7. 840-847.

Pinel, G.; Bichon, E.; Pouponneau, K.; Maume, D.; Andre, F.; Le Bizec, B. Multi-residue method for the determination of thyreostats in urine samples using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry after derivatisation with 3-iodobenzylbromide. *J. Chromatogr., A* 2005, 1085, 247–252.

Pinel G., Mathieu S. Cesbron N., Maume D., De Brabander H. F., Andre F., B. Le Bizec. 2006. Evidence that urinary excretion of thiouracil in adult bovine submitted to a cruciferous diet can give erroneous indications of the possible illegal use of thyrostats in meat production. *Food Additives and Contaminants*; 23(10): 974–980

Vanden Busche J., Noppe H., Verheyden K., Wille K., Pinel G., Le Bizec B., De Brabander H.F. 2009. Analysis of thyreostats: A history of 35 years *analytica chimica acta* 637, 2–12

Vanden Busche J., Vanhaecke L., Deceuninck Y., Verheyden K., Wille K., Bekaert K., Le Bizec B., De Brabander H.F. 2010. Development and validation of an ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method for quantifying thyreostats in urine without derivatisation. *Journal of Chromatography A*, 1217, 4285–4293.

Vanden Bussche J. 2011 Analytical Approaches To Unravel The Semi-Endogenous Status Of Thiouracil – Ph D Thesis Ugent.

Vanden Bussche J. Kiebooms J. A. L., De Clercq N. Deceuninck Y., Le Bizec B., De Brabander H. F., Vanhaecke L. 2011. Feed or Food Responsible for the Presence of Low-

Level Thiouracil in Urine of Livestock and Humans? Journal of agricultural and Food Chemistry. 59, 5789-5792.

Membres du Comité scientifique

Le Comité scientifique est composé des membres suivants:

D. Berkvens, C. Bragard, E. Daeseleire, P. Delahaut, K. Dewettinck, J. Dewulf, L. De Zutter, K. Dierick, L. Herman, A. Huyghebaert, H. Imberechts, G. Maghuin-Rogister, L. Pussemier, K. Raes *, C. Saegerman, M.-L. Scippo*, W. Stevens*, B. Schiffers, E. Thiry, T. van den Berg, M. Uyttendaele, C. Van Peteghem**

*: experts invités

** Ce membre du Comité scientifique s'est distancé de ce dossier et de l'avis donné.

Remerciements

Le Comité scientifique remercie la Direction d'encadrement pour l'évaluation des risques et les membres du groupe de travail pour la préparation du projet d'avis. Le groupe de travail était composé de:

Membres du Comité scientifique	P. Delahaut (rapporteur), C. Van Peteghem, G. Maghuin-Rogister, M.-L. Scippo
Experts externes	L. Vanhaecke (UGent), V. Fievez (UGent), L. Fiems (ILVO)

Cadre juridique de l'avis

Loi du 4 février 2000 relative à la création de l'Agence fédérale pour la Sécurité de la Chaîne alimentaire, notamment l'article 8 ;

Arrêté royal du 19 mai 2000 relatif à la composition et au fonctionnement du Comité scientifique institué auprès de l'Agence fédérale pour la Sécurité de la Chaîne alimentaire;

Règlement d'ordre intérieur visé à l'article 3 de l'arrêté royal du 19 mai 2000 relatif à la composition et au fonctionnement du Comité scientifique institué auprès de l'Agence fédérale pour la Sécurité de la Chaîne alimentaire, approuvé par le Ministre le 9 juin 2011.

Disclaimer

Le Comité scientifique conserve à tout moment le droit de modifier cet avis si de nouvelles informations et données arrivent à sa disposition après la publication de cette version.