

## Oligo-éléments

# Animine lance son programme Speciman

Animine porte dans son nom sa volonté de faire le lien entre l'alimentation animale et la recherche académique. La société basée à Annecy, spécialiste de la nutrition minérale de précision, franchit un pas supplémentaire grâce à son programme Speciman, développé en partenariat avec un laboratoire universitaire basé à Pau.

En cette fraîche journée du début de l'hiver, une vingtaine de visiteurs arpentent la technopole Hélioparc de l'Université de Pau. Ils viennent de France, d'Italie, d'Espagne, du Royaume-Uni et d'Allemagne et sont distributeurs de l'entreprise Animine. Ils sont invités à découvrir le nouveau programme de recherche Speciman, développé par la société française spécialiste de la nutrition minérale de précision et le laboratoire, l'Institut des sciences analytiques et de physico-chimie pour l'environnement et les matériaux (Iprem). Une dizaine d'auditeurs suivent le programme en visioconférence depuis l'Asie et le continent américain.

### Programmes de recherche

« Nous sommes une Unité mixte de recherche, explique Dirk Schaumlöffel, directeur de recherche au CNRS, qui associe le CNRS et l'Université de Pau et des pays de l'Adour (Uppa). Nous comptons 200 scientifiques de 25 nationalités. Notre laboratoire s'organise en trois pôles : la chimie analytique, physique et théorique ; la chimie et la microbiologie envi-

ronnementale ; et enfin la physique-chimie des surfaces et des matériaux polymères. »

Olivier Donard, directeur du laboratoire Iprem, explique comment le laboratoire a bénéficié récemment de fonds publics, au sein du programme national Marss. Ceux-ci ont permis de faire de l'Iprem un véritable Centre de référence pour la spécialisation et la réactivité chimique appliquée à l'imagerie 3D dans l'environnement, le vivant, les applications industrielles et les matériaux : « Les fondements scientifiques du projet Marss ont pour but d'explorer et de développer de nouvelles frontières en ce qui concerne les nouveaux champs de connaissances dans l'identification et formulation des métaux et métalloïdes dans la nature intime de la matière, de leur signature isotopique, leur forme chimique, jusqu'à la structuration biomoléculaire, et d'identifier grâce à l'imagerie, leur localisation dans la structure de la matière afin de mieux en comprendre l'impact et les propriétés ».

Stéphane Durosoy, directeur et fondateur d'Animine, revient sur l'origine du lien existant aujourd'hui entre Ani-

mine et l'Iprem : « Nous sommes une compagnie indépendante française fournisseur d'oligo-éléments. Actifs depuis 11 ans, nous sommes connus pour la sécurité et la qualité de nos produits, ainsi que pour l'importance que nous accordons à la recherche ». Grâce à un financement de l'Agence nationale de la recherche (ANR), Animine et l'Iprem ont pu constituer un programme de recherche baptisé Speciman pour *speciation of metals in animal nutrition*. « Grâce à son programme LabCo, l'ANR encourage les collaborations stratégiques entre des PME et des laboratoires publics autour de projets de recherche, décrit Stéphane Durosoy. Les projets sont soutenus financièrement et doivent durer au minimum quatre ans. » Engagé en 2021, Speciman va continuer au moins jusqu'à 2025 ; le projet est soutenu à hauteur de 350 000 euros. Speciman est ainsi le second LabCom attribué à l'échelle nationale dans le domaine des additifs destinés à l'alimentation animale.

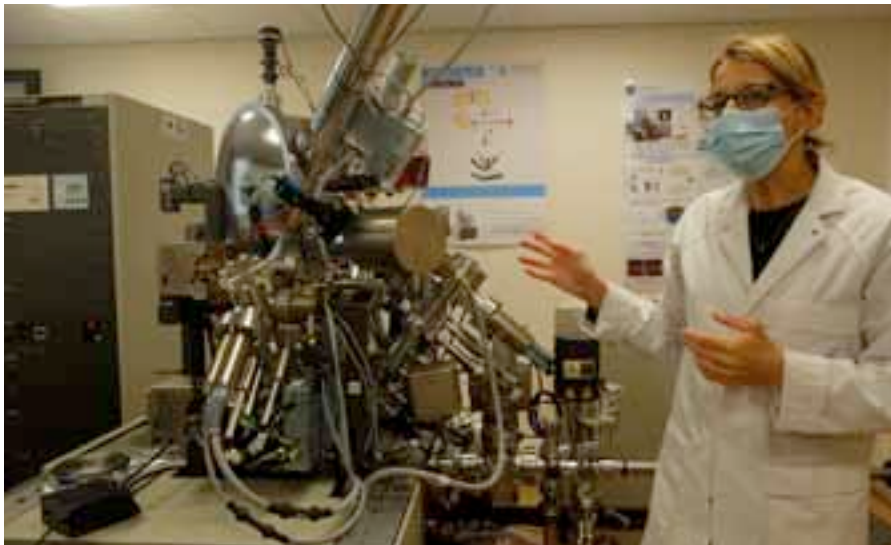
« L'objectif de Speciman est donc de quantifier les oligo-éléments, de qualifier leur forme chimique et d'étudier leur loca-



Florent Penen montre le nano-Sims (secondary ion mass spectrometry) : « Sur cet équipement, le temps d'analyse est relativement long, on traite un à deux échantillons par jour ».



Florent Penen (à gauche) a rejoint Animine en novembre 2020 comme ingénieur en développement analytique. Il a réalisé sa thèse sous la direction de Dirk Schaumlöffel, directeur de recherche au CNRS (à droite).



Cécile Courrèges, ingénieure de recherche au CNRS, présente le spectromètre de masse de type Tof-Sims pour time of flight-secondary ion mass spectrometry.

lisation afin d'acquérir des connaissances sur leur métabolisme digestif et sur leurs sites et mécanismes d'absorption et accumulation », résume Stéphane Durosoy. Pour cela, Speciman peut compter sur les outils analytiques à la pointe de la technologie de l'Iprem.

### Un ingénieur en développement analytique

Pour mener ce projet, Animine a recruté Florent Penen, en novembre 2020, comme ingénieur en développement analytique. Difficile de trouver meilleur profil : Florent Penen a achevé une thèse en chimie analytique au laboratoire Iprem, sous la direction de Dirk Schaumlöffel. Spécialisé en bio-imagerie, le chercheur maîtrise les technologies de métallomique et d'analyse subcellulaire. Il fait visiter le laboratoire et en décrit les équipements. « L'objectif du programme Speciman est la compréhension du devenir des oligo-éléments, dans l'aliment puis une fois ingérés par l'animal dans son système digestif, notamment ses interactions avec le microbiote, puis une fois excrété dans l'environnement. »

La première étape d'analyse des oligo-éléments est généralement leur concentration : « Au siècle dernière, on faisait du titrage. Puis est apparue la spectrométrie à absorption atomique puis la spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif l'ICP-MS, décrit le chercheur. Ce sont des techniques en milieu humide qui mettent en œuvre des

diluants. Ce sont des analyses longues et coûteuses en réactifs, commente-t-il. En conséquence, ce sont des analyses rarement menées en routine dans la filière de l'alimentation animale fait remarquer Stéphane Durosoy. De ce fait, les teneurs en minéraux des régimes alimentaires sont méconnues et les apports comprennent en général des valeurs de marge de couverture très importantes, au détriment d'un usage économique et raisonné. L'idée est de développer une méthode analytique plus économique afin d'aboutir à des suppléments plus justes. »

Le deuxième niveau d'analyse est la spéciation, c'est-à-dire l'analyse de la forme chimique des oligo-éléments : elle est essentielle car la biodisponibilité des oligo-éléments en dépend. « On doit la



Stéphane Durosoy, directeur et fondateur d'Animine.

chercher dans chaque matrice : l'aliment, les déjections, les sols, précise Florent Penen. Les techniques analytiques sont très spécifiques et délicates, de même que la préparation des échantillons, afin de ne pas modifier la forme chimique des oligo-éléments. » « Là encore la conséquence de ces difficultés analytiques est que nous disposons de peu de connaissances sur cet aspect, souligne Stéphane Durosoy. Les théories et les concepts décrivant la forme chimique et la digestibilité des oligo-éléments sont nombreux sur le marché. Mais nos clients manquent de preuves scientifiques consensuelles. »

Enfin, l'analyse de la localisation des oligo-éléments nécessite d'identifier la présence des oligo-éléments dans des endroits précis « avant et au-delà de la barrière intestinale, dans le chyme puis dans les tissus et organes », explique Florent Penen. « La littérature décrit avec précision la diffusion transcellulaire, mais l'absorption intestinale paracellulaire reste peu documentée, témoigne Stéphane Durosoy. Cette méconnaissance permet à des entreprises de communiquer sur des voies d'absorption hypothétiques, semant la confusion chez les nutritionnistes. »

### Des outils analytiques de pointe

Florent Penen décrit alors les techniques disponibles à l'Iprem pour réaliser ces recherches. La technique la plus accessible est l'ICP-MS, la spectrométrie de masse par plasma à couplage inductif couplée à la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC). Au niveau supérieur, l'Iprem dispose en outre d'un spectromètre de masse à plasma à couplage inductif précédé d'une ablation laser afin de générer de l'imagerie. Le laboratoire est doté d'un XPS, un spectromètre photoélectrique X, qui permet de réaliser un profilage chimique dans les surfaces, ce que l'on appelle de l'analyse de la chimie de surface.

Au niveau des technologies encore plus performantes, l'Iprem possède son propre ICP-MS multicollecteur et deux spectromètres de masse à ions secondaires (Sims). « L'ICP-MS multicollecteur permet de tracer la signature isotopique d'un élément métallique et donc d'en retracer l'origine géographique, décrit-il. C'est

une technique mise en œuvre dans la qualification des huiles d'olives, des vins, etc. Elle nous sera utile afin de différencier les produits Animine des autres sources d'oligo-éléments. » Quant au nano-spectromètre de masse à ions (Sims), il délivre une image de la surface de l'échantillon qui permet de mettre en évidence la distribution spatiale des isotopes : « Cela nous permet de suivre le devenir des éléments au niveau subcellulaire et de comprendre le flux des nutriments ».

Enfin, l'Iprem a accès à la technologie du Synchrotron : « Il y a 31 synchrotrons dans le monde dont deux en France, l'un à Paris et l'autre à Grenoble », décrit Florent Penen. Un synchrotron est un accélérateur de particules (des électrons) qui produit le rayonnement synchrotron, une lumière extrêmement brillante qui permet d'explorer la matière inerte ou vivante : « Les électrons sont accélérés à une vitesse proche de celle de la lumière, puis injectés dans un anneau de stockage de plusieurs centaines de mètres de périmètre. La lumière émise lors de l'accélération des électrons dans cet anneau est collectée afin de sonder la matière. Pour résumer, cette infrastructure nous permet d'étudier à la fois la spéciation chimique et la localisation des métaux. Cette technique nous permet de faire de la spéciation chimique et de la localisation ». Les recherches menées sur les synchrotrons sont nombreuses mais peu d'entreprises ont accès à cet équipement de haute technologie. Les laboratoires académiques peuvent, eux, y réserver des créneaux de recherche. « Grâce à son partenariat avec l'Iprem au sein de Speciman, Animine va avoir accès à cette technique de pointe, dans la continuité du programme Suminapp. »

Le programme Speciman va donc se dérouler en trois phases. Une première phase de recherche concernera la biodisponibilité des sources d'oligo-éléments. « Nous allons étudier in vitro les cinétiques de la dissolution des métaux dans différents milieux, à partir d'oxydes, de sulfates et de différents chélates », décrit Stéphane Durosoy. Ensuite, Speciman va se pencher sur l'absorption intestinale : « Nous observerons où se passe l'accumulation au niveau des tissus et comment se déroule le transport au niveau intracellulaire, dans l'entérocyte », poursuit Florent Penen.

Enfin, la dernière étape consistera à observer l'impact des oligo-éléments sur les communautés bactériennes du tractus digestif : « Les oligo-éléments impactent-ils la composition du microbiote intestinal ? Comment cela se traduit-il dans son profil et dans ses fonctions ? Comment les suppléments minéraux impactent certains pathogènes ou des populations bactériennes ayant un rôle dans la santé digestive ? », interroge Stéphane Durosoy.

## Visite guidée

Pour bien comprendre les technologies mises en œuvre dans Speciman, les participants à cette journée sont invités à rencontrer les chercheurs dans leurs laboratoires. Premières explications avec Sandra Mounico-Cheramy, chargée de recherche au CNRS : « La chimie de surface étudie la distribution spatiale des métaux sur un échantillon afin d'améliorer la compréhension des mécanismes biologiques dans lesquels les métaux sont impliqués, décrit-elle. L'ablation laser permet de scanner la surface de l'échantillon. Le laser permet de travailler à des résolutions spatiales extrêmement fines : de l'ordre du micromètre. Les détecteurs enregistrent les signaux propres à l'oligo-élément et l'intensité du signal est représentée par un code couleur ce qui donne une véritable cartographie ». Dans le cadre de



Sandra Mounico-Cheramy, chargée de recherche au CNRS, montre une coupe d'alevins réalisée dans un cryostat : « La congélation permet une coupe de quelques dizaines de microns d'épaisseur. Le froid permet de ne pas altérer la distribution des métaux ».

Speciman, son laboratoire sera amené à observer des biopsies intestinales afin de cartographier la présence des oligo-éléments : « Nous le faisons déjà dans le domaine de la nutrition animale, en poisson, pour comprendre le métabolisme du sélénium ».

Pour rentrer dans la cellule, de l'ordre du micron, Cécile Courrèges ingénieure de recherche au CNRS, présente le spectromètre de masse de type Tof-Sims pour time of flight- secondary ion mass spectrometry. « On parle ici de Sims statique. L'énergie du faisceau des ions primaires est à faible énergie ce qui permet d'analyser des éléments et des molécules à la surface. Le Tof-Sims permet d'envoyer des ions à la surface des échantillons qui entraînent l'éjection d'ions secondaires. Nous analysons sur 1 à 2 nanomètres, c'est l'extrême surface. Ce sont des techniques sous ultravide afin que les particules de l'air ambiant ne perturbent pas l'analyse. Nous récoltons ainsi des informations de type élémentaires et moléculaires. »

« L'un des avantages du Tof est qu'il nécessite peu de préparation d'échantillon, relève-t-elle. Les tissus des animaux nécessiteront d'être déshydratés, c'est-à-dire congelés puis cryofixés, ce que nous pouvons faire grâce à un module en température qui permet de le conserver dans son état natif. » Dans la dernière salle, le nano-Sims est dit Sims dynamique : « Il fonctionne avec un faisceau de plasma à froid, décrit Florent Penen. Avec ce traitement, il n'y a plus de molécule, seulement des éléments, uniquement des ions ».

Face à ces chercheurs, tous plus motivés les uns que les autres et passionnés par leur sujet de recherche, Stéphane Durosoy conclut : « Il s'agit du programme de recherche scientifique le plus ambitieux mené à ce jour pour explorer le devenir des oligo-éléments au niveau digestif et leur absorption intestinale chez les animaux d'élevage ».

■ Françoise Foucher