



Carrefours de l'innovation
agronomique

19 décembre 2018 | Amphithéâtre de l'APCA | PARIS



INRA
SCIENCE & IMPACT

Actes du colloque

Contaminants alimentaires : approches émergentes
pour connaître et prévenir le risque

**CONTAMINANTS ALIMENTAIRES
APPROCHES ÉMERGENTES
POUR CONNAÎTRE ET PRÉVENIR LE RISQUE**

.....
ACTES DE LA JOURNÉE
DU 19 DÉCEMBRE 2018

.....
ÉDITION DES ACTES :

Jean Pierre Cravedi, Béatrice Darcy-Vrillon, Catherine Esnouf,
Florence Forget, Sandrine Gelin, Catherine Renard.

Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-NC-ND 3.0).



<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « Innovations Agronomiques », la date de sa publication, et son URL).

SOMMAIRE

CARACTÉRISATION DES DANGERS DES CONTAMINANTS ALIMENTAIRES : CE QUI CHANGE ; CONSÉQUENCES POUR LA RECHERCHE ET L'ÉVALUATION	5
<i>Cravedi J.-P.</i>	
PROMESSES ET DÉFIS DES NOUVELLES APPROCHES MÉTHODOLOGIQUES SANS A PRIORI POUR LA MISE EN ÉVIDENCE DE CONTAMINANTS ÉMERGENTS ET LA CARACTÉRISATION DE L'EXPOSOME	NC
<i>Antignac J.-P.</i>	
LA PHYTOPHARMACOVIGILANCE : UNE SURVEILLANCE INTÉGRÉE DES EXPOSITIONS DES POPULATIONS ET DES EFFETS INDÉSIRABLES DES PRODUITS PHYTOPHARMACEUTIQUES	14
<i>Volatier J.L., Boissonnot R., Botta F., Eymery F., Fröchen M., Hulin M., Mathiot C., Papadopoulos A., Quintaine T., Réty J., Merlo M., Yamada O.</i>	
NANOPARTICULES ET FRANCHISSEMENT DE LA BARRIÈRE INTESTINALE - INTERACTIONS AVEC LE MICROBIOTE ET DEVENIR SYSTÉMIQUE [RÉSUMÉ]	19
<i>Houdeau E.</i>	
BISPHÉNOLS, PERTURBATIONS DES VOIES MÉTABOLIQUES ET RÔLES DANS L'OBÉSITÉ ET LE DIABÈTE	20
<i>Oliviero F., Mselli-Lakhal L.</i>	
LES COMPOSÉS NÉOFORMÉS TOXIQUES ET LEUR REMÉDIATION - FOCUS SUR LES PRODUITS CARNÉS	35
<i>Meurillon M., Engel E.</i>	
MYCOTOXINES ET MÉTAUX : CO-CONTAMINATION ET TOXICITÉ CROISÉE	NC
<i>Oswald I.</i>	
IMPACT DES MÉLANGES DE PESTICIDES	49
<i>Gamet-Payraastre L.</i>	
PROJET EUROMIX. VERS UNE DÉMARCHE NORMALISÉE, À L'ÉCHELLE EUROPÉENNE, POUR ÉVALUER LES RISQUES DES MÉLANGES DE CONTAMINANTS CHIMIQUES	57
<i>de Sousa G., Zucchini-Pascal N., Hichard G., Tutoy M., Rouimi P., Rahmani R.</i>	

CARACTÉRISATION DES DANGERS DES CONTAMINANTS ALIMENTAIRES : CE QUI CHANGE ; CONSÉQUENCES POUR LA RECHERCHE ET L'ÉVALUATION

Cravedi Jean-Pierre ¹

¹ UMR 1331 Toxalim, INRA, Université de Toulouse, ENVT, INP Toulouse.
180, chemin de Tournefeuille, BP 93173, F-31027 Toulouse Cedex 3

Correspondance : jean-pierre.cravedi@inra.fr

RÉSUMÉ

En dépit de progrès majeurs en matière de biologie moléculaire et cellulaire, de biologie des systèmes et de bioinformatique, la toxicologie appliquée à l'évaluation du risque des substances chimiques et des toxines n'a pas beaucoup évolué au cours des dernières décennies. Un changement conceptuel et méthodologique radical doit émerger si l'on veut pouvoir tester à moindre coût et rapidement un grand nombre de produits chimiques, seuls ou en mélanges. Le développement et la mise en application d'outils *in vitro*, recommandés par les instances réglementaires internationales, sont des étapes essentielles de ces changements.

Les toxicologues doivent désormais s'appuyer sur la biologie des systèmes, l'intégration de données multi-omiques et les bases de données publiques pour combler l'écart entre les événements moléculaires initialement repérés et les effets néfastes à l'échelle d'un système biologique, puis d'un individu. Outre les données de protéomique et de transcriptomique capables d'appréhender les changements moléculaires et cellulaires, les approches métabolomiques renseignent sur les niveaux de métabolites ou les flux de métabolites altérés par les toxiques et peuvent guider le choix de biomarqueurs précoces spécifiques et sensibles pour le développement ultérieur de dépistages haut débit. L'utilisation des données massives et leur modélisation devraient permettre de mieux prédire les liens entre exposition aux substances toxiques et états physiopathologiques.

Mots-clés : Contaminants alimentaires, Toxicité, Risque, Approches globales, Santé.

ABSTRACT: Hazard characterization of food contaminants: what is changing; consequences for research and risk assessment

Despite major advances in molecular and cellular biology, systems biology and bioinformatics, toxicology applied to the risk assessment of chemicals and toxins has not changed significantly during the last decades. A radical conceptual and methodological change must emerge if a large number of chemicals or their combinations in mixtures need to be tested at a lower cost and quickly. The development and implementation of *in vitro* tools, recommended by international regulatory authorities, are essential steps in these changes.

Toxicologists must now rely on the potential of systems biology, multiomics data integration and public databases to bridge the gap between initial molecular events and adverse effects at the level of a biological system and then an individual. In addition to proteomics and transcriptomics data capable of informing about potential changes in cell function and infrastructure, metabolomics approaches provide information about metabolite levels or flows of metabolites altered by toxic substances and can guide the selection of specific and sensitive early biomarkers for the subsequent

development of high throughput screening. The analysis of big data and their modelling should make it possible to better predict the links between exposure to toxic substances and physiopathological conditions.

Keywords: Food contaminants, Toxicity, Risk, Global approaches, Health

INTRODUCTION

L'évaluation du risque chimique en sécurité sanitaire des aliments comprend plusieurs étapes qui se rapportent d'une part au danger que présentent les substances faisant l'objet de l'évaluation et d'autre part au degré d'exposition du consommateur à ces substances; le danger ne devenant un risque qu'à la condition qu'une exposition ait lieu. L'étape de caractérisation du danger telle qu'elle a été définie par le Codex Alimentarius (2003) pour les agents chimiques présents dans l'alimentation consiste à évaluer la nature des effets adverses de ces agents pour la santé et à déterminer la relation dose-réponse. Ce processus repose jusqu'à présent sur des études toxicologiques qui doivent permettre de mettre en évidence un effet toxique sur tous les organes, un éventuel effet cancérigène (mutagène ou non), un risque de malformation des fœtus, ou encore une atteinte de la reproduction. Les données toxicologiques dont dispose l'évaluateur du risque émanent d'études de toxicité aiguë, sub-chronique, ou chronique, établies à plusieurs doses et menées pour l'essentiel chez le rongeur. Bien plus rarement des travaux plus spécifiques, destinés à investiguer le caractère neurotoxique, immunotoxique, ou *métabolique* de la substance, ou encore des travaux destinés à déterminer son mécanisme d'action peuvent figurer au dossier. Ces informations sont généralement complétées par des données toxicocinétiques, c'est-à-dire relatives à l'absorption, la distribution tissulaire, la transformation et l'élimination de la substance. Sur la base de l'ensemble de ces données scientifiques et en tenant compte des incertitudes propres aux extrapolations de l'animal à l'Homme et aux différences interindividuelles, des groupes d'experts compétents établissent des valeurs toxicologiques de référence. L'évaluation des risques au niveau de la population générale est réalisée en comparant la VTR aux données d'exposition humaine dont on dispose. Parmi les valeurs toxicologiques de référence couramment utilisées : la dose journalière admissible (DJA) ou la dose journalière tolérable (DJT) pour les agents qui ne sont pas intentionnellement ajoutés. La DJA ou la DJT constituent une estimation de la quantité d'une substance présente dans un aliment ou dans l'eau de boisson, exprimée en fonction du poids corporel, qui peut être ingérée quotidiennement pendant toute la durée d'une vie sans risque appréciable.

Cette démarche présente de nombreuses limites. Tout d'abord, la pertinence de ces études animales pour évaluer des risques pour des populations humaines hétérogènes et le plus souvent exposées à des concentrations beaucoup plus faibles d'agents présumés toxiques est quelquefois remise en question. Par ailleurs, ces études sont coûteuses et longues : par exemple un test de cancérogénicité chez le rat, selon la ligne directrice de l'OCDE 451 coûte plus de 700 000 euros et dure 2 ans et un test de reprotoxicité peut coûter plus d'un million d'euros (Meigs et al., 2018). L'association européenne de protection des plantes (European Crop Protection Association, ECPA) estime qu'une fois un produit phytosanitaire découvert, sa mise sur le marché nécessite plus de 10 ans de travaux et les études de toxicité (environ 30 études expérimentales, essentiellement chez l'animal) coûtent environ 20 millions d'euros (ECPA, 2013). Ce coût constitue un frein à la mise en œuvre des tests et a pour conséquence un déficit, voire une absence totale de données pour plusieurs milliers de substances auxquelles nous sommes susceptibles d'être exposés.

Au 31 mai 2018, dernière échéance d'enregistrement des substances chimiques dans l'Union Européenne, le règlement REACH a permis l'enregistrement de 20 000 substances fabriquées ou importées à plus d'une tonne par an (ECHA, 2018), mais plusieurs estimations indiquent que nous sommes exposés à plus de 100 000 substances chimiques (Geiss et al., 1992 ; Carpenter et Bushkin-Bedient, 2013) auxquelles s'ajoutent les nombreuses toxines et les substances néoformées.

Outre le fait de ne pas être adaptés aux défis posés par le nombre croissant de substances chimiques mises sur le marché, il est également fait reproche aux tests toxicologiques en usage d'avoir recours à un nombre très élevé d'animaux, se heurtant ainsi aux recommandations européennes et à la pression sociétale. Dans une publication récente, Meigs et al. (2018) évaluent à 11,5 millions le nombre d'animaux utilisés en 2011 à des fins scientifiques en Europe dont environ 500 000 pour des études toxicologiques. Signalons que le parlement européen, dans sa directive 2010/63/UE relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques prévoit l'application de la règle des 3R. Cette règle prévoit (1) de remplacer l'animal vivant par des modèles *in vitro* (par exemple des cellules) ou *in silico* (recours à la bioinformatique), (2) de réduire le nombre d'animaux par le rejet d'études non indispensables ou la limitation des répétitions inutiles, (3) de raffiner les méthodes expérimentales par le choix réfléchi des modèles et des protocoles, l'enrichissement du milieu de vie des animaux, et la formation du personnel.

Enfin, la plupart des tests sur lesquels s'appuie la toxicologie réglementaire fournissent peu d'informations sur les modes et les mécanismes d'action, qui sont pourtant essentiels à la compréhension des différences interspécifiques et interindividuelles de toxicité.

1. Le rapport du « National Research Council » (NRC) américain : une vision en rupture avec les approches toxicologiques traditionnelles

Dès 2007, le rapport « Toxicity testing in the 21st century : a vision and a strategy » publié par le National Research Council aux Etats Unis (NRC, 2007), montrait pour la première fois comment les progrès scientifiques récents en matière de toxicologie pouvaient être utilisés afin d'améliorer l'évaluation du danger des agents chimiques pour la santé. La proposition consiste à abandonner progressivement les observations recueillies chez l'animal au profit d'approches *in vitro* permettant d'examiner comment ces agents perturbent les voies de réponse cellulaire (appelées voies de toxicité) capables d'entraîner des effets néfastes sur la santé humaine. Parmi les méthodologies à privilégier figurent le criblage *in vitro* à moyen et haut débit, la toxicologie computationnelle, la biologie des systèmes, la modélisation. Cette nouvelle approche, largement menée *in vitro* à partir de cellules humaines, pourrait être plus représentative de la biologie humaine que les extrapolations animal-homme sur lesquelles sont jusque-là basées les évaluations de risque. Le rapport du NRC souligne également que les études expérimentales utilisent souvent des doses bien plus élevées que celles auxquelles l'Homme peut être exposé, ce qui peut rendre incertaine l'interprétation des résultats. Il recommande d'effectuer des essais de toxicité à des doses représentatives de l'exposition de la population et donc de mieux connaître celle-ci.

Ce rapport a servi de socle au plan stratégique de l'agence américaine de protection de l'environnement (US-EPA) pour l'évaluation de la toxicité des agents chimiques et à la mise en place du consortium américain Tox21, constitué, outre l'US-EPA du National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS), du National Toxicology Program (NTP), du National Institute of Health (NIH) et de la Food and Drug Administration (FDA). Ce consortium a pour objectif de promouvoir le développement de modèles et de tests capables de mieux prédire la dangerosité des substances

et de coordonner le programme ToxCast, actuellement en cours, qui ambitionne de cribler les voies de toxicité de plus de 10 000 composés (dont des mélanges) à partir de plusieurs modèles cellulaires. Parmi les priorités de l'initiative Tox21 figurent : (1) une meilleure compréhension des processus et des voies biologiques clés de l'organisme, (2) le développement d'essais à haut débit (à l'aide de systèmes *in vitro* ou d'animaux phylogénétiquement inférieurs) capables de déterminer comment ces voies et processus sont affectés par les produits chimiques, (3) de développer des méthodes prédictives basées sur la modélisation mathématique afin prévoir le danger que présente un produit chimique, (4) de prioriser les produits chimiques nécessitant une évaluations toxicologique approfondie.

Le consortium Tox21 a permis de développer, de valider et d'optimisé plus de 100 essais *in vitro* basés sur des cellules humaines en utilisant un criblage quantitatif à haut débit. Huang et al. (2016) ont ainsi produit 50 millions de données sur la perturbation endocrinienne et le stress, obtenues à partir d'environ 10 000 produits chimiques. Les auteurs ont été en mesure de regrouper les composés par structure et par profil d'activité et ont montré que les données recueillies *in vitro* offraient une meilleure prédictibilité de la toxicité chez l'Homme que ne le permettaient les données recueillies chez l'animal. Ils ont toutefois précisé que les données haut débit obtenues jusqu'à présent étaient surtout intéressantes pour repérer les substances qui nécessitaient des études approfondies.

Dans la logique du rapport du NRC de 2007, du plan stratégique de l'EPA, de Tox21 et de ToxCast, le gouvernement américain a lancé en 2011 le programme « Human Toxome » visant à déterminer *in vitro* toutes les voies biochimiques impliquées dans les réactions des cellules aux substances toxiques (Hartung et McBride, 2011 ; Bouhifd et al., 2015 ; Fasani et al., 2016). Ce programme de recherches entend utiliser les approches globales dites « omiques » (principalement transcriptomique, et métabolomique) à partir de systèmes cellulaires pour cartographier et annoter les voies toxicologiques activées par une exposition aux substances chimiques, puis de développer les outils informatiques permettant l'analyse, l'intégration et la visualisation des données provenant des différentes plateformes et enfin de mettre en place une base de données sur ces voies toxicologiques.

2. L'apport de la biologie des systèmes et de la métabolomique en particulier, à la caractérisation du danger des substances chimiques.

Le développement de la biologie moléculaire dans les années 1980-2000, a été suivi, au cours des deux dernières décennies de l'automatisation et de la miniaturisation des méthodes d'analyse des réactions moléculaires et, parallèlement, de progrès notoires en bio-informatique. Ces sauts conceptuels et méthodologiques ont donné lieu à l'accumulation de millions de données relatives aux interactions dynamiques entre composants d'un système vivant. En matière de toxicologie, dans un nombre croissant de cas, il est devenu possible de comprendre et de modéliser les réactions entre système vivant et substance(s) toxique(s). Si la biologie des systèmes a commencé avec l'étude des gènes, et des protéines d'un organisme, pour quantifier les changements dans le génome, le transcriptome (ensemble des ARN messagers issus de l'expression d'une partie d'un génome) ou le protéome (ensemble des protéines présentes dans un organisme, un tissu ou une cellule), c'est l'étude du métabolome (ou métabolomique) qui offre la réponse la plus intégrée à une perturbation donnée.

La métabolomique a été définie par Nicholson et al. (1999) comme « la mesure quantitative de la réponse métabolique dynamique d'un organisme vivant à un stimulus physiologique, pathologique, ou à une modification génétique ». La réponse est captée par une empreinte métabolique (signa-

ture biologique ou « métabolome ») qui correspond à la mesure, généralement en spectrométrie de masse ou en résonance magnétique nucléaire (RMN) des métabolites de faible poids moléculaire (Figure 1). Dans une certaine mesure, ces métabolites sont définis par la transcription des gènes et les changements de protéines, ce qui en fait la science « omique » la plus proche du phénotype et la plus intéressante pour la toxicologie (Robertson, 2005 ; Bouhifd et al., 2013, 2014 ; Ramirez et al., 2013 ; Bonvallot et al., 2018).

La métabolomique a été principalement utilisée pour des études de toxicité *in vivo* basées sur des profilages métaboliques réalisés à partir d'échantillons de plasma, d'urine ou de tissu (Cabaton et al., 2013 ; Tremblay-Franco et al., 2015). La publication récente de plusieurs études de toxicité *in vitro* reposant sur la modification du métabolome cellulaire montre que la métabolomique est très bien adaptée aux études de caractérisation du danger des contaminants chimiques à faibles doses (Cabaton et al., 2018 ; Ramirez et al., 2018). Certaines études ont été en mesure de mettre en évidence des relations doses-effets et d'identifier des biomarqueurs de toxicité (Cabaton et al., 2018). Les travaux de García- Cañaveras et ses collaborateurs (2016) effectués sur la lignée hépatocytaire humaine HepG2, ont permis de classer et d'étudier la toxicité hépatique de diverses substances en fonction de leur mode d'action.

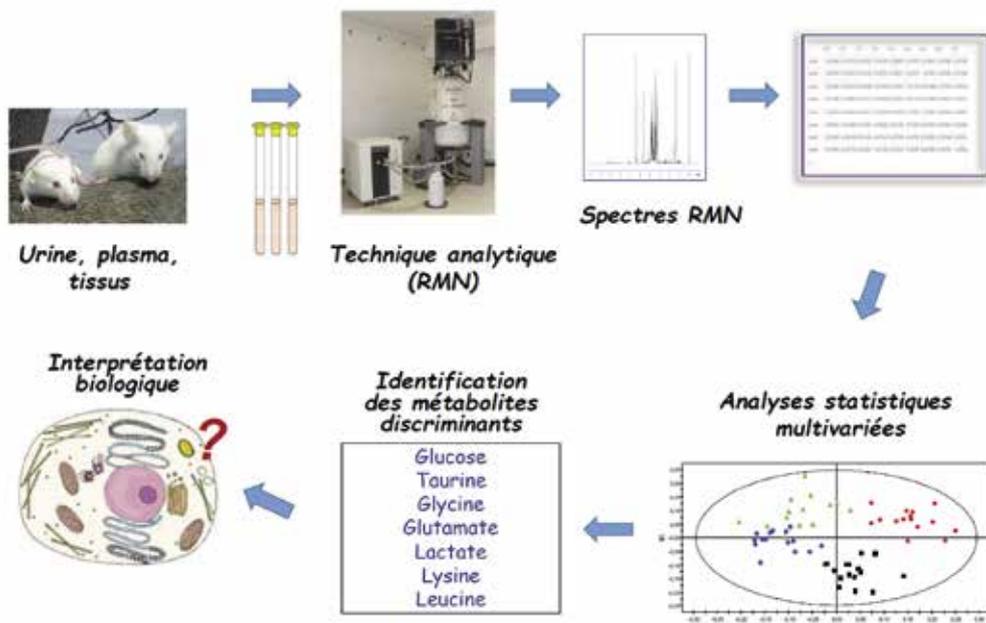


Figure 1 : Descriptif de l'approche métabolomique. La démarche présentée ici repose sur une analyse RMN. Le même processus s'applique pour une analyse en spectrométrie de masse.

Les réponses métabolomiques obtenues dans cette étude ont également abouti à l'acquisition de nouvelles connaissances sur les événements moléculaires sous-jacents à l'hépatotoxicité. Bien que de l'avis même des auteurs, les résultats recueillis demandent à être confirmés, les données produites par ce type d'étude suggèrent qu'à brève échéance, ces outils pourront être utilisés dans le criblage des agents chimiques pour en évaluer la toxicité.

3. Le concept « d'adverse outcome pathway »

Si l'on connaissait parfaitement les étapes successives des mécanismes biologiques qui établissent le lien entre l'exposition aux substances chimiques et la survenue d'une pathologie, la caractérisation du danger pourrait alors se baser non plus sur l'identification d'un effet néfaste observé chez l'animal à des niveaux de dose élevés mais à partir de l'étude de ces voies biologiques sur des modèles expérimentaux *in vitro*. Les chemins de l'effet adverse ou « adverse outcome pathway » (AOP) est un concept élaboré afin d'améliorer la compréhension de la toxicité des substances chimiques. Les approches intégrées en matière d'essai et d'évaluation (IATA) sont quant à elles des méthodes destinées à être mise en oeuvre en pratique afin de guider l'évaluateur sur la stratégie à appliquer pour évaluer une substance chimique.

L'OCDE a produit depuis 2013 plusieurs documents guides sur le concept d'AOP visant à soutenir une évaluation des risques fondée sur le raisonnement mécanistique (OECD, 2017). Il s'agit d'une séquence logique d'événement biologiques causalement liés, faisant suite à l'exposition à un produit chimique et ayant pour conséquence finale un effet nocif sur la santé (Figure 2). Dans ce cas, les événements précoces qui sont prédictifs d'effets adverses suffisent à la caractérisation du danger et peuvent être mesurés dans avoir recours à des expérimentations *in vivo*.

L'événement moléculaire initiateur (MIE ou molecular initiating event) est le premier élément d'une série d'événements clés (KEs ou key events) reliés entre eux par des relations ou key event relationships (KERs). L'effet néfaste est ensuite défini comme le résultat de l'événement moléculaire initiateur et des événements clés. Cet effet néfaste peut être décrit au niveau individuel ou au niveau populationnel (Thybaud et Troise, 2016).

Landesmann (2016) a par exemple décrit la chaîne d'évènement initiée par l'alkylation des protéines et conduisant à la fibrose hépatique. La fibrose hépatique chez l'Homme est associée à l'exposition à des produits chimiques tels que la diméthyl nitrosamine. C'est un processus à long terme dans lequel l'inflammation, la destruction et la réparation des tissus se produisent simultanément, avec une production soutenue de facteurs de croissance et de cytokines. Ces phénomènes proviennent d'une interaction complexe entre divers types de cellules hépatiques, différents récepteurs et voies de signalisation qui entraîne un déséquilibre de la matrice extracellulaire. En raison de ces interactions multiples, il n'existe pas de modèle cellulaire capable d'évaluer la fibrose hépatique. Une description suffisamment détaillée des événements conduisant à la fibrose du foie facilite une stratégie de test sans avoir recours à un modèle cellulaire sophistiqué. L'événement d'initiation moléculaire (MIE) est ici l'alkylation de la protéine, qui après 5 événements clefs conduit *in fine* à la fibrose hépatique.

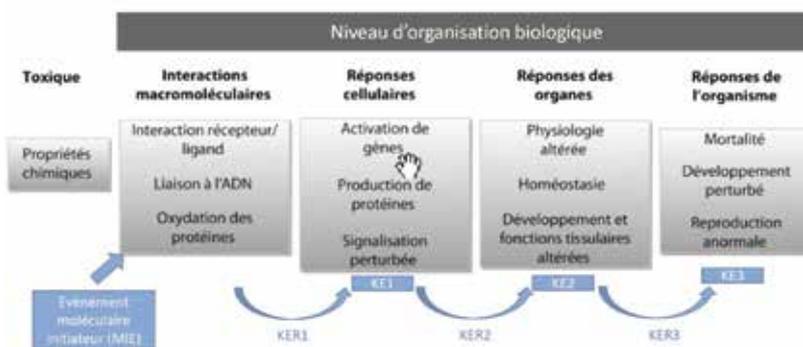


Figure 2 : Le concept d'AOP. Voir la signification des abréviations dans le corps du texte. D'après Coumoul et al., 2017.

Une base de données interactive et mutualisée (wiki AOP) recueille les AOP ayant fait l'objet d'un processus d'approbation scientifique.

4. La recherche européenne et les nouveaux paradigmes toxicologiques

La commission européenne, en contribuant dans le cadre du programme H2020 au financement du projet EU-ToxRisk (An integrated European « Flagship » program driving mechanism-based toxicity testing and risk assessment for the 21st century) montre que la volonté de l'Europe est, comme celle des Etats-Unis, de conduire un changement de paradigme en toxicologie basé sur une approche intégrée de l'évaluation de la sécurité chimique à partir des mécanismes d'action et n'ayant plus recours à l'expérimentation animale. Ce projet qui a démarré en 2016 intègre largement le concept d'AOP et s'appuie amplement sur les approches à haut débit, et la modélisation. Il s'appuie sur les avancées de la biologie cellulaire, des technologies « omiques », de la biologie des systèmes et de la bioinformatique afin de définir les chaînes d'événements complexes reliant l'exposition chimique à des effets toxiques. Ce projet est axé sur deux domaines: toxicité systémique à doses répétées, en utilisant les poumons, les reins, le foie et le système nerveux comme exemples d'organes cibles potentiels; et toxicité pour le développement et la reproduction. Il entend baser ses études de cas sur les données issues de l'industrie pharmaceutique, cosmétique et phytosanitaire et limiter drastiquement le recours à l'expérimentation animale.

Depuis 2010 l'INRA, en collaboration avec l'INSERM a initié des projets de recherche visant à développer de nouveaux tests *in vitro* (principalement sur la lignées cellulaire hépatique HepaRG) et de nouvelles stratégies de prédiction de la cytotoxicité des contaminants environnementaux basés sur leur mécanisme d'action. Dans cette stratégie figurent la détermination de biosenseurs cellulaires stables adaptés au criblage des polluants, l'identification de biomarqueurs d'effet par des approches de transcriptomique et de métabolomique, l'utilisation d'outils de statistique, de bioinformatique et de modélisation pour intégrer l'ensemble des données afin d'en renforcer la prédictivité. Au plan scientifique, ce travail qui a bénéficié du concours de plusieurs infrastructures telles que Metabohub se poursuit aujourd'hui sur plusieurs fronts: (1) la qualité et la normalisation des systèmes cellulaires d'essais toxicologiques à haut débit; (2) l'acquisition de données métabolomiques et transcriptomiques robustes; (3) les outils de bio-informatique pour l'identification, l'annotation, la preuve de causalité; (4) la caractérisation d'une perturbation fondée sur des réseaux; (5) le lien entre les réseaux métaboliques affectés et les effets adverses; (6) les perturbations produites par des mélanges.

CONCLUSIONS

Les méthodes traditionnelles de la toxicologie ne permettent plus de répondre aux besoins de l'évaluation du risque. Les approches haut débit, basées sur des tests *in vitro*, sont aujourd'hui capables, pour un nombre encore limité de substances de renseigner sur le danger qu'elles présentent et de proposer des priorités d'évaluation. Même si les défis sont considérables, les parties prenantes sont convaincues de la nécessité de mettre en œuvre une méthodologie tirant meilleur parti des données existantes, limitant le recours à l'expérimentation animale et ayant une valeur prédictive au moins égale à celle établie à ce jour. Les progrès constants en matière de phénotypage et la diversité des modèles biologiques disponibles aujourd'hui en laboratoire rendent possible la compréhension moléculaire des voies toxicologiques pouvant être activées par des xé-

nobiotiques. Les approches omiques permettent de caractériser le phénotype moléculaire associé à une exposition d'un système biologique à ces xénobiotiques. Le défi est dorénavant de prédire si cette réponse peut correspondre à celle observée lors d'un désordre physiopathologique et donc d'établir le lien, par des approches bioinformatiques, entre le toxome et les signatures obtenues au cours d'un processus pathologique chez l'Homme

L'identification et la caractérisation de ces voies toxicologiques conduisant *in fine* à un effet adverse chez l'individu ouvre de nouveaux horizons en matière de toxicologie prédictive et d'évaluation du risque. La réduction des incertitudes concernant l'extrapolation « système *in vitro*-homme » dépend à la fois du nombre et de la qualité des données mais aussi de l'interprétation de ces données (intégration de critères toxico-cinétiques dans les modèles, différences entre réponse adaptative et effet adverse).

Références bibliographiques

- Bonvallet N., David A., Chalmel F., Chevrier C., Cordier S., Cravedi J.P., Zalko D., 2018. Metabolomics as a powerful tool to decipher the biological effects of environmental contaminants in humans. *Current Opinion in Toxicology*, 8: 48-59.
- Bouhifd M., Hartung T., Hogberg H.T., Kleensang A., Zhao L., 2013. Review: toxicometabolomics. *J Appl Toxicol* 2013;33:1365–83.
- Bouhifd M., Andersen M.E., Baghdikian C., Boekelheide K., Crofton K.M., Fornace A.J., Kleensang A., Li H., Livi C., Maertens A., McMullen P.D., Rosenberg M., Thomas R., Vantangoli M., Yager J.D., Zhao L., Hartung H., 2015. The human toxome project. *ALTEX* 32, 112–124.
- Bouhifd M., Hogberg H.T., Kleensang A., Maertens A., Zhao L., Hartung T., 2014. Mapping the human toxome by systems toxicology. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology* 115 :24-31
- Cabaton N.J., Canlet C., Wadia P.R., Tremblay-Franco M., Gautier R., Molina J., Sonnenschein C., Cravedi J.P., Rubin B.S., Soto A.M., Zalko D., 2013. Effects of low doses of bisphenol A on the metabolome of perinatally exposed CD-1 mice. *Env Heal Perspect.* 121:586–93.
- Cabaton N.J., Poupin N., Canlet C., Tremblay-Franco M., Audebert M., Cravedi J.-P., Riu A., Jourdan F., Zalko D., 2018. An untargeted metabolomics approach to investigate the metabolic modulations of HepG2 cells exposed to low doses of bisphenol A and 17 β -estradiol. *Front. Endocrinol.* 9:571. doi:10.3389/fendo.2018.00571
- Carpenter D.O., Bushkin-Bedient S., 2013. Exposure to chemicals and radiation during childhood and risk for cancer later in life. *J Adolescent Health* 52:S21-S29.
- Commission du Codex Alimentarius, 2003. Manuel de procédure du Codex Alimentarius, pp. 234.
- Coumoul X., Andujar P., Baeza-Squiban A., Barouki R., Bodin L., et al., 2017. Toxicologie. Dunod, Paris
- ECHA, 2018. <https://echa.europa.eu/information-on-chemicals/registered-substances>
- ECPA, 2013. www.ecpa.eu/sites/default/files/7450_Registration%20brochure_3.pdf
- Fasani R.A., Livi C.B., Choudhury D.R., Kleensang A., Bouhifd M., Pendse S.N., McMullen P.D., Andersen M.E., Hartung T., Rosenberg M., 2016. The Human Toxome Collaboratorium: A Shared Environment for Multi-Omic Computational Collaboration within a Consortium. *Front. Pharmacol.* 6:322. doi: 10.3389/fphar.2015.00322
- García-Cañaveras J.C., Castell J.V., Donato M.T., Lahoz A., 2016. A metabolomics cellbased approach for anticipating and investigating drug-induced liver injury. *Sci Rep.* 6:27239. doi: 10.1038/srep27239
- Geiss F., Del Bino G., Blech G., Nirager O., Orthmann E., Mosselmans G., Powell J., Roy R., Smyrniotis T., Town W.G., 1992. The EINECS inventory of existing chemical substances on the EC market, *Toxicological & Environmental Chemistry*, 37: 21-33, DOI: [10.1080/02772249209357850](https://doi.org/10.1080/02772249209357850)
- Hartung T., McBride M., 2011. Food for thought... on mapping the human toxome. *ALTEX* 28, 83-93.
- Huang R., Xia M., Sakamuru S., Zhao J., Shahane S.A., Attene-Ramos M., Zhao T., Austin C.P., Simeonov A., 2016. Modelling the Tox21 10 K chemical profiles for *in vivo* toxicity prediction and mechanism characterization. *Nat. Commun.* 7, 10425.
- Landesmann B., 2016. Adverse Outcome Pathway on Protein Alkylation Leading to Liver Fibrosis. *OECD Series on Adverse Outcome Pathways*, n°2, Éditions OCDE, Paris, <https://doi.org/10.1787/5j1svwl6g7r5-en>
- Linhart Y.B., Grant M.C., 1996. Evolutionary significance of local genetic differentiation in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 27, 237-277.

- Meigs L., Smirnova L., Rovida C., Leist M., Hartung T., 2018. Animal Testing and its Alternatives - the Most Important Omics is Economics. *Alternatives to animal experimentation* 35:275-305.
- Morand-Prieur M.-E., 2003. Evolution et maintien d'un système de reproduction polymorphe. Approche génétique et écologique de la polygamie chez le frêne commun, *Fraxinus excelsior* L. Thèse de Doctorat, ENGREF, Paris, France, 155 p.
- Nicholson J.K., Lindon J.C., Holmes E., 1999. Metabonomics: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica* 29: 1181–1189.
- NRC, 2007. Toxicity testing in the 21st century: a vision and a strategy. DOI 10.17226/11970.
- Robertson D.G., 2005. Metabonomics in toxicology: a review. *Toxicol Sci* 2005;85:809–22.
- Ramirez T., Daneshian M., Kamp H., Bois F.Y., Clench M.R., Coen M. et al., 2013. Metabolomics in toxicology and preclinical research. *ALTEX* 2013, 30:209–25.
- Ramirez T., Strigun A., Verlohner A., Huener H.-A., Peter E., Herold M., Bordag N., Mellert W., Walk T., Spitzer M., Jiang X., Sperber S., Hofmann T., Hartung T., Kamp H., Van Ravenzwaay B., 2018. Prediction of liver toxicity and mode of action using metabolomics in vitro in HepG2 cells. *Arch Toxicol.* 92: 893-906.
- Sauvant D., Dijkstra J., Meryens D., 1995. Optimisation of ruminal digestion : a modelling approach. In: M. Journet, E. Grenet, M-H. Farce, M. Theriez, C. Demarquilly (Eds.). *Recent developments in the Nutrition of Herbivores. Proceedings of IVth International Symposium on the Nutrition of herbivores*, INRA Editions, Paris, p. 143-165
- Thybaud E., Troise A., 2016. Adverse outcome pathways : concept et exemple. Réseau des écotoxicologues de l'INRA. Fiche thématique N°2 - Avril 2016. <https://www6.inra.fr/ecotox/content/download/4204/45813/.../11.../16-Fiche-AOP.pdf>
- Tremblay-Franco M., Cabaton N.J., Canlet C., Gautier R., Schaeberle C.M., Jourdan F., Sonnenschein C., Vinson F., Soto A.M., Zalko D., 2015. Dynamic metabolic disruption in rats perinatally exposed to low doses of bisphenol-A. *PLoS ONE* 10:e0141698. doi: 10.1371/journal.pone.0141698
- OECD, 2017. Revised Guidance Document on Developing and Assessing Adverse Outcome Pathways Series on Testing & Assessment N° . 184

LA PHYTOPHARMACOVIGILANCE : UNE SURVEILLANCE INTÉGRÉE DES EXPOSITIONS DES POPULATIONS ET DES EFFETS INDÉSIRABLES DES PRODUITS PHYTOPHARMACEUTIQUES

**Volatier J.L.¹, Boissonnot R., Botta F., Eymery F., Fröchen M., Hulin M., Mathiot C.,
Papadopoulos A., Quintaine T., Réty J., Merlo M., Yamada O.**

¹ Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses)
14, rue Pierre et Marie Curie, F- 94700 Maisons-Alfort

Correspondance : Jean-Luc.volatier@anses.fr

1. Présentation de la phytopharmacovigilance

Dans le cadre de la loi d'avenir pour l'agriculture, l'alimentation et la forêt du 13 octobre 2014, la mise en place d'un dispositif de phytopharmacovigilance a été confiée à l'Anses. L'objectif de ce dispositif de vigilance est d'identifier et caractériser les effets indésirables des produits phytopharmaceutiques (PPP) sur la santé humaine et les écosystèmes dans leur ensemble, ainsi que les phénomènes d'apparition de résistances.

La phytopharmacovigilance vient compléter les missions de l'Anses en matière d'évaluation *a priori* des risques liés aux PPP et de délivrance et de retrait des décisions d'autorisations de mise sur le marché (AMM) dans le cadre du règlement européen 1107/2009. Par ailleurs, ce dispositif s'inscrit dans l'axe 3 du plan Ecophyto 2 (Evaluer, maîtriser et réduire les risques et les impacts des produits phytopharmaceutiques sur la santé humaine et sur l'environnement).

L'objectif de la phytopharmacovigilance est de détecter au plus tôt les signaux qui peuvent amener à prendre des mesures de prévention ou de limitation des risques liés aux PPP. Pour répondre à cet objectif, la phytopharmacovigilance repose sur trois modalités complémentaires de recueil de données et de production de connaissances: (1) un réseau de dispositifs de surveillance ou de vigilance, (2) le recueil et l'analyse de signalements spontanés et (3) des études *ad hoc*.

(1) La phytopharmacovigilance repose sur la collecte systématique et régulière d'informations produites par les dispositifs de surveillance et de vigilance déjà existants, concernant l'homme, les animaux d'élevage et sauvages (dont l'abeille domestique), les écosystèmes dans leur intégralité (biodiversité, cultures, faune, flore, air, eau, sol) mais aussi les aliments et l'apparition de phénomènes de résistance aux PPP.

Ce réseau de dispositifs comprend les plans de surveillance des ministères sur l'eau, les aliments et les mortalités massives aiguës des abeilles ainsi que le recueil des effets non intentionnels dans le cadre de la Surveillance Biologique du Territoire (SBT). Participent également à ce réseau : les Centres anti-poison et de toxicovigilance (CAP-TV) coordonnés par l'Anses, le dispositif Phyt'attitude de la Mutualité sociale agricole (MSA), les études de l'Agence nationale de santé publique France (Santé Publique France) dans le cadre de sa mission de suivi des effets sur la santé humaine et des expositions, la cohorte Agrican (Agriculture et Cancer) pilotée par le Centre François Baclesse, le réseau SAGIR pour les effets éventuels sur la faune sauvage géré par l'Office national de la chasse et de la faune sauvage (ONCFS), l'Institut technique scientifique de l'abeille et de la pollinisation (ITSAP), le Laboratoire central de surveillance de la qualité de l'air (LCSQA) ainsi que les Associations agréées de surveillance de la qualité de l'air (AASQA).

Les organismes participant à la phytopharmacovigilance sont désignés par l'arrêté du 16 février 2017 ¹.

L'ensemble des données collectées sont rassemblées dans des fiches de synthèse par substance mises en ligne sur le site de l'Anses ² et qui seront présentées.

(2) En complément des données collectées par les dispositifs de surveillance et de vigilance partenaires, l'Anses reçoit des signalements des acteurs professionnels comme les titulaires d'AMM, les fabricants, les importateurs, les distributeurs ou utilisateurs professionnels de PPP, les conseillers et formateurs de ces utilisateurs. Plus largement, les professionnels de santé ainsi que toute autre personne peuvent signaler des événements sanitaires indésirables à la phytopharmacovigilance. A cette fin, l'Anses a mis en place un outil des signalements des effets indésirables sur son site ³ qui sera présenté. D'ores et déjà, certains signaux, qui seront décrits, ont conduit à des modifications des conditions d'AMM.

(3) Enfin, des études *ad hoc* sont réalisées lorsque les informations disponibles *via* les réseaux ou les signalements sont peu nombreuses ou ne permettent pas de conclure quant à l'existence d'une association entre une exposition et la survenue d'effets indésirables. Ainsi, l'Anses a souhaité la mise en place d'une campagne exploratoire de surveillance des pesticides dans l'air ambiant qui permettra de disposer d'une photographie, au niveau national, de la présence des PPP dans l'air. La connaissance des expositions professionnelles, de celles des riverains ainsi que de l'impact des PPP sur la biodiversité constituent également des sujets d'études prioritaires pour la PPV.

Sur la base de l'ensemble de ces informations, la phytopharmacovigilance contribue à :

- Permettre, si nécessaire, l'adaptation des conditions d'AMM des produits aujourd'hui commercialisés (par exemple par la réduction des doses, l'adaptation des conditions d'application ou le retrait d'une AMM) ;
- Définir des mesures de gestion transversale, par exemple pour la protection des personnes vivant à proximité des zones traitées ;
- Contribuer à s'assurer du respect des interdictions d'usages de produits, notamment ceux dont les substances actives ne sont plus approuvées au niveau européen.

Une présentation plus détaillée de la phytopharmacovigilance est disponible sur le site internet de l'Anses ou dans (Merlo, 2018).

2. Intérêt de l'approche intégrative de la phytopharmacovigilance pour mieux caractériser et interpréter les expositions alimentaires

En matière d'expositions des consommateurs aux résidus de produits phytopharmaceutiques, la phytopharmacovigilance repose principalement sur les dispositifs suivants : les plans de surveillance et de contrôle de la Direction Générale de l'Alimentation (DGAL) du ministère en charge de l'agriculture et ceux de la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes (DGCCRF) du ministère en charge de l'économie, la Direction Générale de la Santé du ministère en charge de la santé pour l'eau de distribution. Les études de l'alimentation totale EAT pilotées par l'Anses (Anses, 2016) et les travaux de recherche en la matière complètent ces principales sources de données.

¹ <https://www.legifrance.gouv.fr/eli/arrete/2017/2/16/AGRG1704711A/jo/texte>

² <https://www.anses.fr/fr/content/les-fiches-de-phytopharmacovigilance-pour-plus-d%E2%80%99informations-sur-les-substances>

³ <https://www.anses.fr/fr/content/signalement-deffets-ind%C3%A9sirables-li%C3%A9s-%C3%A0-lutilisation-de-produits-phytopharmaceutiques>

En complément de la population générale, des populations de consommateurs nécessitent des études spécifiques du fait de leur exposition ou de leur sensibilité particulière. On peut citer notamment les enfants dont les enfants en bas âge, les femmes enceintes, les riverains de zones agricoles consommant des produits du jardin potentiellement exposés à une dérive de pulvérisation, les habitants de territoires ultramarins.

Les expositions alimentaires chroniques aux PPP calculées dans le cadre de la phytopharmacovigilance reposent sur la méthode standard de calcul utilisée au niveau européen par l'Autorité européenne de sécurité sanitaire des aliments EFSA et s'appuyant sur les consommations alimentaires individuelles, les moyennes de concentration en résidus présents dans les aliments et le poids corporel des consommateurs.

$$E_i = 1/p_i \times \sum_j c_{ij} \times t_j$$

Où :

E_i est l'exposition de l'individu i

p_i est le poids de l'individu i

c_{ij} est la consommation sur longue période de l'individu i pour l'aliment j

t_j est la teneur ou concentration du résidu ou substance étudiée dans l'aliment j

Le fondement théorique de cette approche est qu'un consommateur peut être exposé parfois à une concentration supérieure à la moyenne des concentrations en résidus dans un aliment donné, parfois à une valeur inférieure à cette moyenne mais que sur longue période il est exposé à une concentration moyenne (application de la loi des grands nombres aux nombreux actes de consommation pour un consommateur au cours de sa vie). Cette hypothèse n'est pas toujours vérifiée pour un consommateur s'approvisionnant de façon particulière. C'est notamment le cas d'un consommateur consommant régulièrement ou occasionnellement des aliments d'agriculture biologique, auquel cas la part de consommation de ces produits dans le régime alimentaire doit être pris en compte ainsi que la différence de concentration en résidus entre les produits d'agriculture biologique et les produits conventionnels.

Une autre exception à l'application de la formule ci-dessus est l'eau de distribution dans la mesure où un foyer consommant de l'eau du robinet est exposé à la concentration moyenne de l'eau du réseau auquel le foyer est connecté et non à la concentration moyenne de l'ensemble des réseaux. Des petits réseaux de distribution en milieu rural peuvent parfois subir des concentrations en résidus de pesticides nettement plus élevés que la moyenne des réseaux. La variabilité géographique des concentrations en résidus de pesticides dans l'eau distribuée est connue au travers de la base SISE-Eaux du ministère en charge de la Santé. Cette variabilité géographique a été considérée dans l'étude de l'Observatoire des Résidus de Pesticides de l'Anses, sur la contribution de l'eau aux expositions par voie alimentaire aux pesticides, (Anses, 2013).

L'approche intégrative de la phytopharmacovigilance a aussi pour objectif de prendre en compte simultanément les différentes sources et voies d'exposition. Le projet d'étude d'exposition des riverains de zones agricoles mené en collaboration avec Santé Publique France va ainsi considérer de façon intégrée les expositions par voie aérienne ou cutanée et par voie alimentaire en comparant les doses internes de résidus ou imprégnations et les comportements alimentaires, notamment le recours à la consommation d'aliments du jardin (autoconsommation).

3. Des usages agricoles aux résidus dans les aliments

La phytopharmacovigilance s'appuie sur les études observant les usages des PPP. On peut citer la base de donnée des ventes BNVD gérée par l'INERIS qui tend à produire des données de plus en plus fines du point de vue géographique. On peut aussi citer les études pratiques agricoles d'Agreste, service statistique du ministère en charge de l'agriculture.

Ces données permettent d'identifier les couples aliments-substances pour lesquels la présence de résidus est très probable. Cette information apporte un élément d'interprétation aux nombreuses données de résidus non détectés dans les aliments. En effet, une non détection peut signifier une absence de résidus mais elle peut aussi signifier une présence de résidus à des niveaux inférieurs aux limites de détection.

Cependant, il convient également de rechercher des résidus dans des aliments qui ne devraient pas théoriquement en contenir compte tenu des usages autorisés et des pratiques agricoles. En effet, il est possible que des dérives de pulvérisation ou des pratiques agricoles différentes pour des produits importés ou des usages d'une même substance pour d'autres objectifs que la protection des cultures puissent conduire à la présence inattendue de résidus de pesticides dans les aliments. La détection récente de l'herbicide prosulfocarbe sur des pommes alors que cette substance n'est pas autorisée pour cette culture s'explique par la dérive de pulvérisation observée pour cette substance à partir de cultures céréalières. Les conditions d'autorisation de mise sur le marché pour les produits à base de prosulfocarbe ont été modifiées suite à ce signalement de la phytopharmacovigilance : utilisation obligatoire de buses anti-dérive, distance minimale entre le lieu d'épandage et les cultures voisines sensibles (vergers, cressonnières...etc).

4. L'intégration des expositions des consommateurs aux études épidémiologiques

La phytopharmacovigilance est attentive aux signaux provenant des études épidémiologiques et notamment celles mettant en relation les expositions des consommateurs aux résidus de PPP et des effets sanitaires.

Principalement, deux grandes sources de données sur les pathologies des populations peuvent être mobilisées :

- Les grandes cohortes épidémiologiques telles que les études Nutrinet ou E4N pour la population générale ou les études Elfe et Eden pour les femmes enceintes et les jeunes enfants,
- Les bases de données médico-administratives issues de la Sécurité sociale.

Ces deux types de données peuvent être utilisées simultanément si elles sont connectées entre elles.

Les expositions des consommateurs sont caractérisées dans les cohortes soit par mesurages des concentrations en substances ou métabolites dans les tissus ou fluides biologiques humains tels que les cheveux, le sang ou les urines, soit par calcul des expositions selon le modèle décrit en partie II. Dans le premier cas, le mesurage biologique ou imprégnation est la conséquence de diverses expositions dont l'exposition par voie alimentaire.

La contribution de la phytopharmacovigilance à la seconde approche de l'exposition par calcul consiste notamment à faciliter l'accès des épidémiologistes aux données de concentration des aliments en résidus de pesticides. Ces données sont associées aux données de consommation

alimentaire recueillies dans les cohortes pour calculer des expositions alimentaires chroniques. C'est ce qui a été fait pour la cohorte Elfe dans le cadre du projet ANR Popeye. La publication en open data des données brutes de résidus dans les aliments issues des études de l'alimentation totale EAT2 et EAT infantile participe à cette démarche.

Une voie d'avenir pourrait constituer à mettre en relation les grandes bases de données privées sur les achats alimentaires des ménages avec les bases de données médico-administratives de la sécurité sociale dans une optique de fouille de données pour générer des hypothèses. Cette voie est difficile car les achats alimentaires des ménages ne permettent pas d'identifier les consommations individuelles et notamment celles des adultes et des enfants au sein du ménage. Elles ne couvrent pas non plus la consommation hors domicile. Dans tous les cas, le recours à des données détaillées de concentrations de résidus dans les aliments est nécessaire.

CONCLUSION

La phytopharmacovigilance constitue une nouvelle approche intégrative de recueil et d'interprétation des signaux d'effets indésirables des produits phytopharmaceutiques sur l'homme et l'environnement. Les expositions par voie alimentaire des consommateurs font partie des données observées. Pour être interprétées, elles doivent être comparées aux autres sources et voies d'exposition comme les voies aériennes ou cutanées. Les données d'imprégnation c'est-à-dire les concentrations des substances ou de leurs métabolites dans les tissus ou fluides biologiques doivent être mises en relation avec les données d'exposition alimentaire et de résidus dans les aliments pour être interprétées. Ces résidus doivent aussi être mis en relation avec les pratiques agricoles et les importations pour comprendre leur origine. Enfin, les données d'exposition par voie alimentaire sont indispensables à l'interprétation des données épidémiologiques pour la population générale comme pour les populations particulières (jeunes enfants, femmes enceintes...). Une approche intégrative des expositions et des risques est donc nécessaire dans ce domaine des produits phytopharmaceutiques, ce qui nécessite de la part de la phytopharmacovigilance un mode de fonctionnement en réseau avec de nombreux partenaires d'horizons et de disciplines diverses et complémentaires.

Références bibliographiques

Anses, 201. Evaluation des risques liés aux résidus de pesticides dans l'eau de distribution, contribution à l'exposition alimentaire totale, rapport d'étude scientifique, Observatoire des Résidus de Pesticides, septembre, 211 pages

Anses, 2016. Etude de l'alimentation totale infantile, tome 2 – partie 4 résultats relatifs aux résidus de pesticides, rapport d'expertise collective, septembre, 372 pages

Merlo, 2018. La phytopharmacovigilance : une surveillance intégrée des effets indésirables des produits phytopharmaceutiques, juin 2018, Limoges

NANOPARTICULES ET FRANCHISSEMENT DE LA BARRIÈRE INTESTINALE - INTERACTIONS AVEC LE MICROBIOTE ET DEVENIR SYSTÉMIQUE

Houdeau Eric ¹

¹ INRA Toxalim UMR 1331 (Centre de Recherche en Toxicologie Alimentaire), Equipe Endocrinologie et Toxicologie de la Barrière Intestinale (ENTéRisk), Université de Toulouse, INRA, ENVT, INP-Purpan, UPS, Toulouse, France.

Correspondance : eric.houdeau@inra.fr

RÉSUMÉ

Les nanotechnologies dans l'industrie alimentaire trouvent des applications à toutes les phases de la chaîne de transformation pour produire des aliments ou des boissons, jusqu'à leur conditionnement. Elles concernent l'utilisation de particules nanodimensionnées (taille comprise entre 1 et 100 nm) ajoutées directement à des denrées (additifs alimentaires inorganiques, micelles nanométriques pour l'encapsulation d'ingrédients bioactifs) ou incorporées dans des emballages afin d'améliorer la conservation des aliments (gain en propriétés mécaniques, barrières aux intrants) ou renseigner sur leur état sanitaire (nano-capteurs de substances indésirables, pathogènes ou allergènes). Qu'elles soient intentionnellement ajoutées le long de la chaîne alimentaire, ou au contact d'aliments via leur packaging (contamination possible par migration), les nanoparticules ingérées par voie orale sont soupçonnées de risques pour la santé humaine. La physico-chimie particulière liée à la nanodimension permet à ces particules de passer les barrières biologiques, dès la bouche puis dans l'intestin, avant de diffuser dans le sang pour s'accumuler dans les organes systémiques (foie, rate, cerveau) où leur forte réactivité chimique est source d'effets potentiellement toxiques. Dès l'intestin, la question d'un éventuel effet des nanoparticules alimentaires sur le microbiote intestinal a récemment été posée, à l'exemple d'autres agents chimiques dans l'alimentation (e.g., émulsifiants, édulcorants, contaminants d'emballages) connus pour induire une altération dans l'écologie et/ou l'activité métabolique du microbiote (appelée dysbiose intestinale). Des travaux pionniers se sont intéressés aux propriétés biocides naturelles du nano-Argent, lesquelles sont susceptibles de fragiliser la santé de l'hôte compte tenu de l'importance du microbiote intestinal dans le développement et l'équilibre de nombreuses fonctions physiologiques (digestives, système immunitaire, fonctions métaboliques et cérébrales). Face aux applications actuelles ou promises des nanoparticules dans des produits ultra-transformés, exposant le consommateur à des doses faibles mais chroniques, il est nécessaire d'évaluer les risques sanitaires liés à leur ingestion. Cette démarche passe par la caractérisation des effets à long terme sur la flore intestinale, la compréhension des mécanismes de franchissement des barrières biologiques et la mise au point de tests spécifiques pour évaluer le potentiel de danger(s) lié à leur bioaccumulation dans l'organisme, jusqu'au fœtus.

BISPHÉNOLS, PERTURBATIONS DES VOIES MÉTABOLIQUES ET RÔLES DANS L'OBÉSITÉ ET LE DIABÈTE

Oliviero F. ¹, Mselli-Lakhal L. ¹

¹ UMR 1331 Toxicologie Alimentaire (ToxAlim), INRA, centre INRA de Toulouse

Correspondance : laila.lakhal@inra.fr

RÉSUMÉ

De nombreuses études expérimentales, cliniques et épidémiologiques récentes montrent que l'exposition à des contaminants de notre environnement pourrait perturber les fonctions métaboliques et endocriniennes des organismes. Ceci contribuerait au développement de pathologies métaboliques telles que l'obésité et le diabète de type II.

Le Bisphénol A, un contaminant œstrogéno-mimétique largement exploité dans l'industrie des emballages alimentaires plastiques, présente un impact sur le métabolisme énergétique. Depuis l'interdiction du BPA, des analogues structuraux tels que le BPS et le BPF sont utilisés. Les effets de ces derniers sont moins connus mais des études suggèrent des effets obésogènes. Cette revue est principalement axée sur les effets métaboliques du BPA ainsi que ses cibles, et sur les analogues structuraux du BPA utilisés en substituts.

Mots-clés : Bisphénols, Maladies métaboliques, Métabolisme énergétique

ABSTRACT: Bisphenols - Disruption of metabolic pathways - roles in obesity/diabetes

Numerous experimental, clinical and epidemiological studies reveal that exposure to environmental contaminants may disrupt endocrine and metabolic functions of organisms. This could contribute to the development of metabolic disorders such as obesity and type II diabetes.

Bisphenol A, a widely used xenoestrogen in plastic food packaging industry, affects energy metabolism. Following BPA ban, structural analogues such as BPS and BPF are used. Their effects are less known; however, some studies reveal an obesogenic effect. This review focuses on the metabolic effects and targets of BPA as well as the structural analogues used as substitutes.

Keywords: Bisphenols, Metabolic diseases, Energetic metabolism

INTRODUCTION

Les maladies métaboliques telles que l'obésité, le diabète de Type II et la stéatose hépatique sont en constante augmentation dans les pays industrialisés. Leur pathogénèse est complexe et multifactorielle. Les facteurs d'induction de ces maladies peuvent être d'origine génétique ou liés à un mode de vie trop sédentaire et une alimentation trop riche en lipides et en glucides. En 2002 (Baillie-Hamilton 2002), un nouveau concept a émergé, celui « d'obésogène environnemental » qui stipule que les produits chimiques de notre environnement pourraient également jouer un rôle actif dans l'étiologie de l'obésité (Neel and Sargis 2011). Il a depuis été appuyé par de nombreuses études épidémiologiques et expérimentales faisant le lien entre les troubles métaboliques et certains produits chimiques comme les phtalates, le bisphénol A (BPA) ou encore les organo-étains (Grün, 2010 ; La Merrill et Birnbaum, 2011).

1. Usage des bisphénols

Les bisphénols qui font l'objet de cette étude, forment une famille de composés organiques aromatiques portant deux groupements phénols. Les lettres qui suivent le mot « bisphénol » se réfèrent aux réactifs utilisés lors de la synthèse. Par exemple, le bisphénol A (BPA), le bisphénol le plus connu est issu de la réaction entre deux équivalents de phénol et un équivalent d'acétone. Des analogues du BPA existent également, tel que bisphénol S (BPS) qui est issu de la réaction entre deux équivalents de phénol et un équivalent de trioxyde de soufre.

1.1 Historique

Le BPA fut très étudié dans les années 1930 au cours de la recherche d'oestrogènes de synthèse. Malgré ses effets sur la fonction endocrinienne féminine il ne fut jamais utilisé comme tel, du fait de la découverte à la même époque d'un autre composé, le diéthylstilbestrol (DES), dont les propriétés étaient plus intéressantes. Le DES s'est révélé catastrophique pour des milliers d'enfants qui ont développé des anomalies génitales, de la stérilité et des risques accrus de cancer suite à une exposition in utero (Fénichel et al., 2015).

En 1960, l'utilisation massive du BPA débute dans l'industrie du plastique pour la fabrication industrielle de plastiques de type polycarbonate et de résines époxy. De ce fait, on le retrouve dans le revêtement intérieur de boîtes de conserves, les canettes de boissons et plusieurs emballages alimentaires en plastique. De plus, il entre dans la composition des CD, DVD, de certains produits électroniques et de l'industrie automobile, des téléphones portables, des lunettes et lentilles de contact, ainsi que les tickets de caisse à encre thermique. Les résines époxy contenant du BPA sont également utilisées dans des systèmes de stockage et de transport de l'eau, et dans certains ciments dentaires (Vandenberg et al., 2007). Les dérivés halogénés du BPA présents dans les retardateurs de flamme peuvent également contaminer l'atmosphère des logements (Rudel et al., 2011).

C'est le biologiste Frederick vom Saal, professeur à l'Université du Missouri à Columbia (Etats-Unis) qui est le premier à rapporter des effets de faibles doses de BPA sur le système reproducteur de souris mâles de mères exposés au BPA pendant leur gestation (vom Saal et Hughes 2005). Ces résultats ont été largement confirmés par la suite et on a rapporté des effets du BPA sur le système reproducteur, le système immunitaire ou encore le métabolisme (Rochester, 2013). Le BPA est classé comme perturbateur endocrinien en raison de ses propriétés oestrogénomimétiques démontrées à la fois *in vitro* et *in vivo* (rapport ANSES, 2011).

Ces travaux et les nombreux rapports publiés par l'agence d'évaluation du risque française (ANSES) ont conduit en 2014 l'autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) à réduire d'un facteur 10 la dose journalière admissible du BPA qu'elle avait établie à 0,05 mg/kg/jour en 2006 la ramenant ainsi à 0,005 mg/kg/jour. Le BPA a été interdit dans les biberons au Canada en 2010 puis en France et dans l'union européenne en 2011. Le 24 décembre 2012 la France adopte une loi visant à suspendre, à compter du 1^{er} janvier 2015, la fabrication, l'importation, l'exportation et la mise sur le marché de tout conditionnement à vocation alimentaire contenant du bisphénol A.

1.2 Exposition

Les populations sont exposées au BPA par la voie orale, principalement par le biais de l'alimentation. En effet, le BPA fait partie des MCDA (matériaux au contacts des denrées alimentaires) et peut donc migrer dans les denrées alimentaires et les boissons conditionnées dans des emballages fabriqués à partir de BPA polymérisé, atteignant ainsi le consommateur (Carwile et al., 2009 ; Geens et al., 2011). Les taux de migration dépendent directement des conditions de stockage et d'utilisation, du temps et de la température de chauffage, ainsi que de la durée de conservation et du pH des aliments (Welshons et al., 2006).

De récentes études ont également mis en évidence une exposition cutanée au BPA (Biedermann et al., 2010 ; Zalko et al., 2011). Cette voie d'exposition pourrait concerner des milieux professionnels particuliers autres que le secteur de la fabrication du Bisphénol. La quantité moyenne du BPA présente dans les tickets de caisse est estimée à environ 13,3 g/kg de papier (Liao et Kannan, 2011). La manipulation fréquente de ces tickets provoquerait une absorption quotidienne de 71 µg de BPA par le seul passage transcutané (Biedermann et al., 2010) favorisé par des mains humides, et même après lavage des quantités résiduelles de BPA peuvent être détectées sur l'épiderme (Biedermann et al., 2010).

Depuis l'interdiction du BPA, d'autres bisphénols sont utilisés par les industriels bien que leur potentiel toxique ne soit pas bien connu. Les produits qui contenaient du bisphénol A avant son interdiction, contiennent aujourd'hui d'autres bisphénols comme le bisphénol S qui est autorisé et ne présente pas d'obligation de déclaration. La population n'est pas donc pas à l'abri d'une exposition à d'autres composés perturbateurs endocriniens dont les effets sont moins bien connus et étudiés que ceux du BPA.

Cette revue est principalement axée sur le BPA, ses effets sur le métabolisme énergétique ainsi que ses organes cibles. Dans une dernière partie, les analogues structuraux du bisphénol A sont étudiés pour déterminer s'ils représentent des alternatives fiables.

2. Un lien fort entre bisphénol A et troubles métaboliques

Les premiers effets sanitaires du BPA rapportés ont porté concerné la fonction de reproduction mais très vite d'autres effets ont été rapportés portant plus particulièrement sur des maladies métaboliques comme le diabète ou l'obésité. Du fait de son caractère perturbateur endocrinien le BPA présente une sensibilité qui varie avec les périodes de la vie, la plus vulnérable étant in utero, et des effets plus importants à faibles qu'à fortes doses.

2.1 Etudes épidémiologiques

Les études épidémiologiques ont permis d'explorer, l'impact suspecté du BPA sur diverses fonctions de l'organisme.

Une méta-analyse a été réalisée sur 133 études effectuées chez l'homme et sélectionnées selon la pertinence de l'exposition et de l'étude (Hwang et al., 2018). Cette étude a révélé une association entre l'exposition au BPA et un risque plus élevé de développer un diabète de type II. Les niveaux urinaires et plasmatiques de BPA sont positivement associés à un risque plus important de développer un diabète de type II.

D'autres études épidémiologiques traitent de l'association entre le BPA et les marqueurs de l'obésité, le diabète et les paramètres biochimiques sanguins. L'étude de ces paramètres sur une cohorte de 1455 individus d'une population NHANES a montré une corrélation positive entre les niveaux urinaires de BPA et le risque de diabète et de maladies cardiovasculaires (Calafat et al., 2005; 2008) which are used in baby bottles, as protective coatings on food containers, and for composites and sealants in dentistry. 4-Nonylphenol (NP).

Une étude réalisée sur une cohorte de 2840 enfants et adolescents a montré une association entre les concentrations urinaires de BPA et l'obésité (Trasande et al., 2012). Il existe également une association entre l'exposition au bisphénol A et la résistance accrue à l'insuline, l'obésité générale, l'obésité abdominale et la prévalence du diabète (Lang et al., 2008). De nombreuses études épidémiologiques récentes viennent renforcer ces observations (Carwile et Michels, 2011; Lang et al., 2008; Melzer et al., 2010; Shankar et Teppala 2011).

2.2 Etudes chez l'animal

De nombreuses études effectuées principalement chez le rongeur mettent en évidence un effet du bisphénol A sur différents organes impliqués dans le métabolisme énergétique tels que le foie, le muscle squelettique, le tissu adipeux et le pancréas (Figure 1).

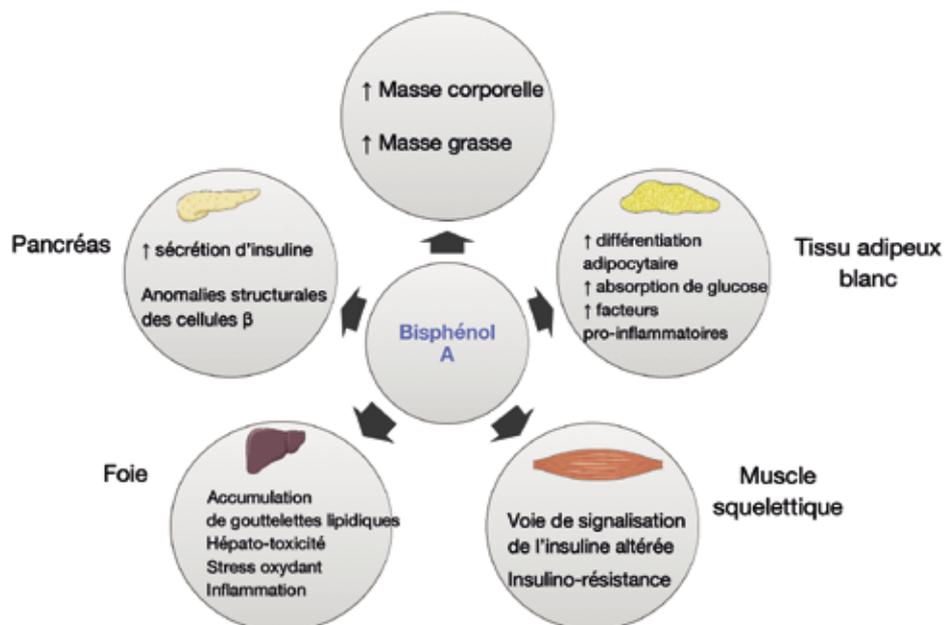


Figure 1 : Synthèse des effets du bisphénol A sur le métabolisme énergétique

2.2.1 Poids des animaux

Il existe une littérature fournie décrivant les effets d'exposition *in utero* et chez l'adulte au BPA sur le poids corporel des animaux. Les observations ne vont pas toujours dans le même sens.

Lorsqu'un gain de poids est observé chez les animaux exposés, ces effets sont souvent spécifiques aux faibles doses, suivant un effet dose-réponse non monotone en U inversé où la masse corporelle mais également la masse des tissus gras sont augmentées à de faibles doses, mais ne le sont pas forcément à des doses plus élevées (Alonso-Magdalena et al., 2010 ; Miyawaki et al., 2007 ; Rubin et al., 2001). Ces effets en « cloche », ne sont pas toujours retrouvés pour les deux sexes. Par exemple, les souris adultes exposées *in utero* au BPA et soumises à un régime alimentaire riche en graisses, présentent une augmentation de leur masse corporelle et de la masse de tissus adipeux. Chez les femelles, le poids des tissus adipeux a augmenté lors d'exposition *in utero* à une faible dose de BPA (0,26 mg/kg/j), mais cet effet est aboli à une dose plus élevée (2,72 mg/kg/j). Chez les mâles, la masse de tissu adipeux est augmentée proportionnellement à la dose de BPA administrée (Miyawaki et al., 2007). L'augmentation du poids corporel est souvent plus prononcée et persistante chez la progéniture femelle, comparée à la progéniture mâle. Mais une exposition à un régime gras fait souvent apparaître une prédisposition à l'obésité chez les mâles (Somm et al., 2009). Ce dimorphisme sexuel n'est pas toujours retrouvé. Dans l'étude de Wei et al. l'augmentation du poids corporel des rats soumis *in utero* au BPA est observée en conditions d'alimentation standard et lorsqu'ils sont soumis à un régime riche en lipides et en carbohydrates quel que soit le sexe (Wei et al., 2011). Chez l'adulte, peu d'études ont été réalisées. L'équipe de Angel Nadal a montré que l'exposition au BPA (100 µg/kg/j) de souris adultes gestantes provoque une augmentation modérée de leur masse corporelle (Alonso-Magdalena et al., 2010).

Les différences obtenues peuvent s'expliquer par les souches utilisées qui diffèrent d'une étude à l'autre et nous savons désormais que certaines souches sont plus sensibles que d'autres aux xéno-estrogènes (Richter et al., 2007). Aussi, la fenêtre d'exposition, le temps et le mode d'administration du BPA (Richter et al., 2007), le type d'alimentation (vom Saal et al., 2005), le conditionnement des animaux sont des facteurs déterminants, à prendre en considération. Ainsi, l'impact du BPA sur la prise de poids des animaux peut varier selon les expériences. Cependant, les observations réalisées au niveau des organes clés du métabolisme énergétique (pancréas, tissu adipeux, foie et muscle) viennent conforter l'idée que le BPA est non seulement un perturbateur endocrinien mais également un perturbateur métabolique.

2.2.2 Pancréas

Chez la souris mâle adulte, une exposition de quelques jours (1 et 4 jours) à de faibles doses de BPA (10 et 100 µg/kg/j) provoque une altération de la tolérance au glucose, une hyperinsulinémie et une augmentation de la teneur en insuline dans les cellules β (Alonso-Magdalena et al., 2006 ; 2008). Cela a également été observé *in vitro* en présence de doses proches de celles retrouvées dans le sérum humain (Alonso-Magdalena et al. 2008). Les îlots de Langerhans de souris adultes exposées à 100 µg/kg/j de BPA présentent une augmentation de la sécrétion d'insuline stimulée en réponse au glucose (Thiago M Batista et al., 2012) (Figure 2).

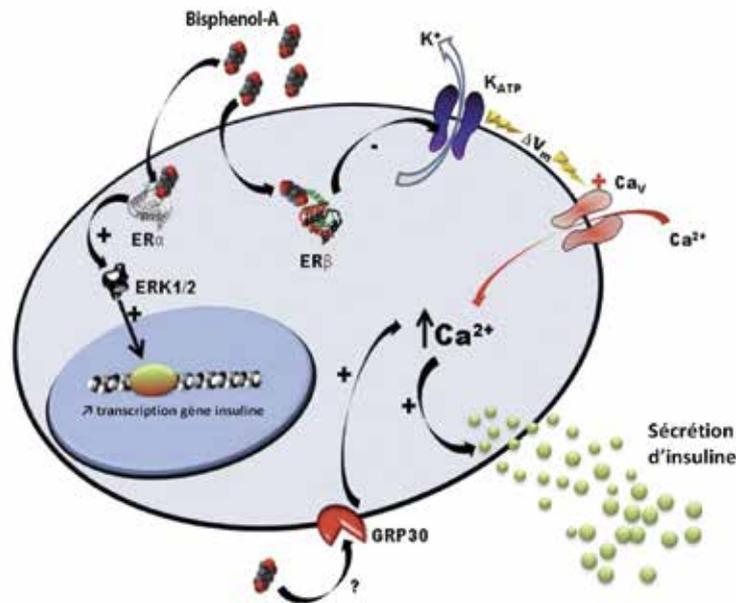


Figure 2 : Modèle d'action du BPA sur la cellule β pancréatique. D'après Ropero, Pang et al., 2012 ; Soriano, Alonso-Magdalena et al., 2012.

Les souris, exposées au BPA (10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$) pendant la période de gestation, développent également une hyper insulinémie qui persiste dans le temps. Leur progéniture présente des prédispositions au développement d'un syndrome métabolique à l'âge adulte (résistance à l'insuline, et altération de la sécrétion d'insuline et de la signalisation calcique dans la cellule β) (Alonso-Magdalena et al., 2010). Des résultats similaires ont été observés chez les rats. Lorsque qu'ils sont soumis à un régime gras ces effets préjudiciables sont plus précoces et exacerbés, surtout à de faibles doses de BPA (50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$) (Wei et al., 2011). Les cellules β des animaux exposés présentent des anomalies de structure. Les mitochondries et le réticulum endoplasmique rugueux sont hypertrophiés. La proportion de granules sécrétoires matures est diminuée chez les animaux soumis à un régime standard, voire absente chez les mâles soumis à un régime gras. Chez ces derniers, les îlots sont désorganisés et les cellules subissent la pycnose (processus de condensation irréversible de la chromatine aboutissant à la nécrose des cellules) (Wei et al., 2011). Aussi, l'exposition chronique de cellules β (TC-6) au BPA modifie l'expression des protéines clés impliquées dans la réponse au stress du réticulum endoplasmique (Makaji et al., 2011).

Contrairement à beaucoup d'observations montrant que le BPA est un agoniste faible des récepteurs aux estrogènes (Dahlman-Wright et al., 2006), Nadal et al. ont montré que, sur les cellules β pancréatiques, le BPA (1 nM) peut imiter les effets de l'estradiol (E2) avec la même puissance (Alonso-Magdalena et al., 2006). Le récepteur ER α non génomique est impliqué dans les effets à long terme du BPA en augmentant la transcription du gène du précurseur de l'insuline via la phosphorylation de ERK1/2 (Alonso-Magdalena et al., 2008), tandis que le récepteur ER β membranaire est impliqué dans l'activité pulsatile de l'insuline. De faibles concentrations de BPA (1 nM) vont diminuer rapidement l'activité de canaux KATP via ER β , ceci génère une dépolarisation de la membrane et l'augmentation du taux de calcium intracellulaire, ce qui déclenche la sécrétion d'insuline (Soriano et al., 2012). D'autres récepteurs pourraient $\gamma\alpha\lambda\epsilon\mu\epsilon\nu\tau$ être mis en jeu, par exemple le récepteur à 7 domaines transmembranaires (RCPG). Le récepteur GPR30/GPER, une cible du BPA (Thomas et Dong, 2006), a récemment été identifié comme un médiateur des effets insulinothropes de l'insuline en réponse à l'E2 (Sharma et Prossnitz, 2011).

Le BPA agit également au niveau des cellules α pancréatiques. Leur exposition au BPA (1 nM) imite l'effet de l'E2 en bloquant le signal Ca^{2+} impliqué dans la libération de glucagon. Ces effets pourraient se faire via les récepteurs membranaires aux estrogènes et mettre en jeu des protéines G activant la nitric oxide synthase (NOS) et la protéine kinase dépendante du cGMP (Alonso-Magdalena et al., 2005).

Ces données suggèrent qu'à long terme, l'exposition au BPA peut être préjudiciable à la fonction des cellules β (et éventuellement des cellules α) et en fin de compte être un facteur important dans l'étiologie de diabète de type 2 et le développement d'une insulino-résistance.

2.2.3 Tissu adipeux

L'obésité est le résultat d'une augmentation de la masse de tissu adipeux en raison d'une augmentation de la taille et du nombre d'adipocytes. Avec plusieurs lignées cellulaires, on a mis en évidence un effet de certains perturbateurs endocriniens environnementaux (4-nonylphénol, tributylétain...) sur ce tissu. Chez l'Homme, les concentrations sériques en BPA sont plus élevées chez les patientes obèses comparées aux patientes dont l'indice de masse corporel est plus faible (Takeuchi et al., 2004). Ce contaminant est détecté dans les tissus adipeux humains analysés, à hauteur de $3,16 \pm 4,11$ ng/g de tissu (Fernandez et al., 2007).

Des études *in vitro* ont montré que le BPA (2 à 20 $\mu\text{g/mL}$) induit la différenciation adipocytaire en augmentant la teneur en triglycérides et l'activité LPL (lipoprotéine lipase), et cela en présence d'insuline (Masuno et al., 2002 ; Wada et al., 2007). Il augmente l'expression génique des facteurs de transcription adipogéniques (C/EBP β : alpha CAAT enhancer binding protein, PPAR γ et FAS) dans les cellules 3T3-L1 préadipocytes (Sargis et al. 2010). Il augmente l'absorption de glucose en conditions basales et en réponse à une stimulation par l'insuline. Cela pourrait s'expliquer en partie par une augmentation de la synthèse du transporteur de glucose GLUT4 (Sakurai et al., 2004). A l'inverse, une étude récente a montré une diminution de l'activité LPL et de l'accumulation de triglycérides suite à une exposition de cellules souches humaines au BPA (Linehan et al., 2012).

Le tissu adipeux n'est pas seulement un organe de stockage d'énergie mais également une glande endocrine qui sécrète divers peptides métaboliquement actifs dotés de propriétés régulatrices et appelés adipocytokines. Le BPA affecte la production et la sécrétion d'adiponectine par les adipocytes 3T3-L1 en culture (Kidani et al., 2010.) et à partir d'explants de tissus adipeux humains (Hugo et al. 2008), le plus souvent, en suivant un effet dose réponse non monotone en U inversé (Ben-jonathan et al., 2010 ; Hugo et al., 2008).

Des études, réalisées chez la souris, ont montré que la progéniture femelle exposée *in utero* au BPA et soumise à un régime alimentaire riche en lipides et en carbohydrates, présente un taux anormalement élevé en leptine, spécifiquement à la faible dose (1 $\mu\text{g/mL}$ de BPA soit environ 0,3 mg/kg/j). Chez les mâles, cet effet n'est pas retrouvé (Miyawaki et al., 2007). Aussi, les rates exposées *in utero* au BPA (environ 70 $\mu\text{g/kg/j}$) présentent une masse excessive de tissu adipeux blanc associée à une hypertrophie des adipocytes et une surexpression de gènes lipogéniques tels que C/EBP-alpha, PPAR γ , SREBP-1c, LPL, FAS et SCD-1. Les mâles semblent moins affectés. Mais une fois exposés à un régime gras, les effets néfastes chez ces derniers sont révélés (Somm et al., 2009)we investigated perigonadal adipose tissue of pups (weight, histology, gene expression. De la même manière, l'exposition périnatale de rats à 50 $\mu\text{g/kg/j}$ de BPA conduit à une hypertrophie des adipocytes dans des conditions de régime standard et riche en graisses, pour les deux sexes (Wei et al., 2011).

2.2.4 Foie

Somm et al. (2009) ont montré, chez le rat, que l'expression hépatique des facteurs lipogéniques SREBP-1c, FAS et ACC est augmentée chez les femelles exposées in utero à environ 70 µg/kg/j de BPA. En parallèle, une étude, réalisée sur la lignée d'hépatocytes humains HepG2, montre une accumulation de lipides intracellulaires en réponse à de faibles doses de BPA (10⁻¹² à 10⁻⁶ M) (Huc et al., 2012). Les études réalisées par Marmugi et al. montrent une accumulation de lipides dans le foie de souris exposées à travers l'alimentation à une faible dose de BPA (5 µg/kg/j de BPA) qui n'est pas retrouvée à de plus fortes doses (50, 500 et 5000 µg/kg/j). Cette accumulation de lipides s'accompagnait d'une hyperinsulinémie et de dérégulations des gènes impliqués dans la lipogénèse et la cholestérogénèse hépatique (Marmugi et al., 2012). Dans une autre étude, les mêmes auteurs ont montré qu'une exposition de 8 mois au BPA à travers l'eau de boisson conduisait à une hyperglycémie et une hypercholestérolémie (Marmugi et al., 2014) and cardiovascular diseases. However, experimental studies have often focused on short-term exposures. In this study, we investigated the effect of several months of BPA exposure on hepatic and plasma metabolic markers in adult mice. Male CD1 mice were exposed during 8 months to five different BPA doses below or equivalent to the current no observed adverse effect level (NOAEL: 5000 µg/kg/day (Figure 3).

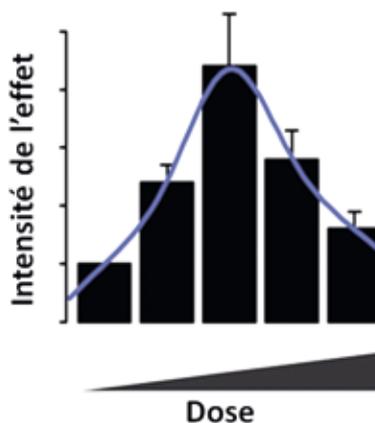


Figure 3 : Illustration d'effets non monotones en U inversé. D'après Marmugi et al., 2012.

De fortes doses de BPA (50mg/kg/j) génèrent, chez le rat, une production d'espèces réactives de l'oxygène et une répression des gènes anti oxydants (catalase glutathion réductase, glutathion transférase, glutathion peroxydase), provoquant une hépatotoxicité (Hassan et al., 2012). Moon et al. (2012) ont montré qu'une exposition aiguë au BPA chez la souris, à une dose inférieure à la NOAEL (1,2 mg/kg/j), peut induire des lésions hépatiques et des dysfonctionnements mitochondriaux par une augmentation du stress oxydant, de l'inflammation et de la peroxydation lipidique. Les transaminases ASAT et ALAT, marqueurs d'une atteinte hépatique, et les niveaux sériques en cytokines inflammatoires IL-6 et TNFα sont fortement élevés, surtout 6 heures après l'injection de BPA. Des études, réalisées sur une lignée d'hépatocytes humains (HepG2), confirment ces observations. Une courte exposition à 10 ou 100 nM de BPA provoque une altération de la structure des mitochondries, mais également de leurs fonctions (diminution du taux de consommation d'oxygène, de la production d'ATP, et de la perméabilité membranaire). Ceci est associé à une augmentation du stress oxydant et de l'inflammation (Huc et al., 2012; Moon et al., 2012).

Asahi et al. (2010) ont montré que le BPA induit un stress du RE par la production de ERO dans les cellules hépatiques de type macrophages. L'activation chronique du stress du RE a un rôle important dans le développement de la résistance à l'insuline et du diabète dans l'obésité (Fu et al., 2011).

L'étude des voies de signalisation dans le foie de souris gestantes montre que la voie de phosphorylation d'Akt (résidu Thr308) est diminuée suite à une exposition au BPA (10 µg/kg/j), reflet d'une insulino-résistance (Alonso-Magdalena et al., 2010). Chez le mâle, un traitement au BPA conduit à une surexpression de la protéine IRS-1 et la voie AKT ne semble pas altérée (Thiago M. Batista et al., 2012).

2.2.5 Muscle

L'étude des voies de signalisation dans le muscle squelettique de souris gestantes a montré que l'insuline provoque, en situation physiologique, une phosphorylation d'Akt. Cette réponse est complètement abrogée chez les animaux exposés au BPA (10 µg/kg/j), reflétant une insulino-résistance (Alonso-Magdalena et al., 2010). Chez le mâle adulte, cette voie est également altérée. Le traitement au BPA peut affecter la voie de signalisation des MAPK. En effet, un pulse d'insuline n'est plus capable de provoquer une augmentation de la phosphorylation de ERK (Thiago M. Batista et al., 2012).

3. Les cibles du BPA

Le BPA est un agoniste faible des récepteurs aux œstrogènes ER α et ER β et sa propriété œstrogéno-mimétique a longtemps été considérée comme responsable des effets qu'il induit. Cependant, il présente une affinité pour les récepteurs ER α et ER β plusieurs milliers de fois moins importante que celle de l'œstradiol (Welshons et al., 2006). De nombreuses études récentes montrent que le BPA interagit avec d'autres récepteurs suggérant que sa propriété œstrogéno-mimétique est loin d'expliquer tous les effets indésirables qu'il provoque (Welshons et al., 2006).

Plusieurs études ont également montré que le BPA se lie au récepteur nucléaire des androgènes (AR) (Paris et al., 2002 ; Sohoni et Sumpter, 1998). L'AR est principalement exprimé dans le testicule, il est présent dans la prostate, les glandes surrénales, les reins, le cerveau et l'hypophyse. Le rôle du récepteur AR dans les organes mâles est très similaire à celui des récepteurs ER dans les organes femelles. Contrairement aux ERs, le BPA est un antagoniste pour AR et son affinité est de l'ordre du micromolaire (Paris et al., 2002). Les effets observés à faible dose pourraient en partie s'expliquer par des actions synergiques à travers les récepteurs ERs (action agoniste et féminisante) et le récepteur AR (action antagoniste, donc antagoniste de l'effet masculinisant).

Le BPA est un ligand puissant du récepteur nucléaire ERR γ (Estrogen Related Receptor gamma) (Brieno-Enriquez et al., 2012 ; Okada et al., 2008 ; Takayanagi et al., 2006). Le fait que ce récepteur se lie sur les promoteurs des gènes cibles des récepteurs des œstrogènes suggère son implication dans les effets de perturbation endocrine induits par le BPA (Vanacker et al., 1999). ERR γ est connu pour réguler positivement la différenciation adipocytaire (Kubo et al., 2009). Au niveau hépatique, il a été identifié comme un médiateur des effets du glucagon et sa surexpression induit l'expression des gènes de la néoglucogenèse : Pepck and G6Pase, et augmente la production de glucose (Kim et al., 2012). Il a également été identifié comme un perturbateur de la signalisation hépatique de l'insuline (Kim et al., 2011). Ainsi il a été suggéré que ERR γ , en combinaison avec les isoformes α et β , jouerait un rôle important dans le contrôle transcriptionnel de l'homéostasie énergétique. Il pourrait donc contribuer à expliquer les effets du BPA sur le métabolisme glucidique.

Le groupe de Watson a proposé que le BPA puisse exercer une partie de ses effets par l'intermédiaire de formes membranaires de ER α et β (mER α et β) (Watson et al., 2011; Watson et al.,

2010). La localisation à la membrane de ces récepteurs pourrait être due à des modifications post-traductionnelles comme la palmitoylation (Marino et al., 2006), ce qui permettrait d'expliquer certains des effets rapides du BPA. En revanche, ce mécanisme d'action ne permet pas d'expliquer les effets à faible concentration. En effet, il est supposé que ces formes membranaires ont la même affinité pour le BPA que les formes nucléaires.

Un deuxième médiateur des effets non génomiques du BPA pourrait être un récepteur transmembranaire couplé aux protéines G : GPR30. Ces récepteurs sont très sensibles à leur environnement. A l'état actif, ils activent une protéine G, déclenchant une cascade de signalisation. Lors d'une exposition prolongée et répétée à leurs ligands, les récepteurs sont désensibilisés et internalisés, provoquant l'arrêt de la transduction du signal. Le récepteur GPR30 est localisé dans le réticulum endoplasmique et il pourrait lier le BPA à faible concentration (Chevalier et al., 2012 ; Wang et al., 2009). Ropero et al. (2012) ont montré que GPR30 est impliqué dans l'effet insulinothrope de l'E2 au niveau de la cellule β -pancréatique, suggérant un mode d'action similaire du BPA.

Les xénosenseurs CAR et PXR sont également des cibles du BPA. Le BPA est décrit comme un agoniste de la forme humaine de PXR (Dekeyser et al., 2011 ; Sui et al., 2012 ; Tabb et al., 2004) mais pas de la forme murine. Ce sont des résidus clés propres à la poche de liaison au ligand de PXR humain qui permettraient au BPA de s'insérer (Sui et al., 2012).

Le BPA possède également la capacité de se lier au récepteur aux hormones thyroïdiennes (TR). Il empêche la fixation de l'hormone thyroïdienne T3 (triiodothyronine) au TR et favorise le recrutement de corépresseurs, entraînant l'inhibition de l'activité transcriptionnelle des gènes cibles du TR (Kitamura et al., 2005 ; Moriyama et al., 2002 ; Zoeller, 2005), même à faibles doses (Iwamuro et al., 2006).

4. Qu'en est-il des autres bisphénols ?

Alors que le BPA n'est plus autorisé dans les contenants alimentaires en France, de nombreuses questions demeurent ouvertes sur les risques présentés par ses substituts et, en particulier, par les bisphénols versions « S » (BPS) et « F » (BPF) qui sont actuellement autorisés par la réglementation et utilisés par les industriels comme substituts au BPA.

4.1 Effets du Bisphénol S

Plusieurs études ont été effectuées sur le BPS, sur son potentiel génotoxique ainsi que sa toxicité oxydative mais également pour évaluer l'effet obésogène du BPS en comparaison à celui du BPA.

Ahmed et Atlas (2016) ont étudié la capacité du BPA et du BPS à induire la différenciation adipocytaire. Pour cela, les auteurs ont traité la lignée pré-adipocytaire 3T3-L1 à différentes concentrations de BPA et BPS et ont évalué l'effet adipogénique par l'accumulation de lipides et l'expression de gènes marqueurs de l'adipogénèse. Cette étude révèle que le BPS, comme le BPA induit une accumulation de lipides, une augmentation de l'expression des gènes adipogéniques tels que la lipoprotéine lipase et la protéine adipocytaire 2 et que cet effet passe par le récepteur nucléaire PPAR γ .

Dans une deuxième étude publiée par la même équipe, les auteurs ont évalué l'effet du BPS sur l'adipogénèse dans des pré-adipocytes primaires humains en culture (Boucher et al., 2016). Les résultats de leur étude démontrent une différenciation des pré-adipocytes primaires humains exposés au BPS avec une surexpression des ARNm et des protéines des gènes clés de l'adipogénèse

ainsi qu'une accumulation de lipides. Ils suggèrent une implication des récepteurs aux œstrogènes E_{α} et du récepteur PPAR γ .

D'autres études effectuées chez la souris, confirment ces résultats. L. Ivry-Del Moral et ses collaborateurs démontrent un effet du BPS sur l'homéostasie lipidique suite à une exposition périnatale de souris C57Bl/6 (Ivry Del Moral et al., 2016). Suite à une exposition périnatale au BPS, la descendance soumise à un régime riche en lipides présente une obésité plus importante que les souris contrôles associée à une masse grasse et une hyper-insulinémie plus importante. L'exposition périnatale au BPS augmente également la clairance plasmatique des triglycérides des descendants, ce qui révélerait un stockage plus important des lipides plasmatiques.

Zhao F et ses collaborateurs ont également montré une dérégulation de l'homéostasie glucidique suite à une exposition au bisphénol S chez le « zebra fish » (Zhao et al., 2018). Une exposition de 28 jours au BPS induit une augmentation de la glycémie à jeun, une induction de la néoglucogénèse et de la glycogénolyse hépatique.

4.2 Autres bisphénols

Une étude effectuée chez le « zebra fish » démontre qu'un traitement des poissons à différentes concentrations de BPF induit une augmentation de la néoglucogénèse et la suppression de la glycolyse (Zhao et al. 2018). De plus, le traitement induit une diminution de l'expression génique et protéique de l'insuline ainsi que de l'expression génique du récepteur à l'insuline ce qui suggère une sensibilité à l'insuline diminuée. Une étude chez l'Homme suggère un effet obésogène de l'accumulation du Bisphénol F au niveau cérébral (Charisiadis et al., 2018). Cette étude a mis en évidence une association entre l'accumulation de BPF au niveau hypothalamique et une incidence plus importante de l'obésité évaluée par l'indice de masse corporelle.

Une étude épidémiologique fait également le lien entre des concentrations urinaires de Bisphénol AF (BPAF) et le diabète de type II (Duan et al., 2018).

CONCLUSION

Le lien entre BPA et maladies métaboliques est bien établi à travers des études épidémiologiques et expérimentales. L'exposition à ce contaminant entraîne des dérégulations de différents organes impliqués dans la régulation du métabolisme et à travers l'activation de plusieurs récepteurs nucléaires. Ces effets sont souvent observés à de faibles doses et la période périnatale constitue une fenêtre d'exposition particulièrement sensible. Peu d'études ont été réalisées avec les analogues du BPA. Elles portent principalement sur les BPS et BPF suggérant le même effet obésogène de ces contaminants que celui observé avec le BPA. Ces études révèlent la nécessité d'études plus approfondies sur les analogues du BPA avant qu'ils ne puissent être utilisés en remplacement de ce dernier.

Références bibliographiques

- Ahmed S., Atlas E., 2016. Bisphenol S- and Bisphenol A-Induced Adipogenesis of Murine Preadipocytes Occurs through Direct Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Activation. *International Journal of Obesity* 40(10):1566–73.
- Alonso-Magdalena P. et al., 2010. Bisphenol A Exposure during Pregnancy Disrupts Glucose Homeostasis in Mothers and Adult Male Offspring. *Environmental Health Perspectives* 118(9):1243–50.
- Alonso-Magdalena P. et al., 2005. Low Doses of Bisphenol A and Diethylstilbestrol Impair Ca^{2+} Signals in Pancreatic α -Cells through a Nonclassical Membrane Estrogen Receptor within Intact Islets of Langerhans. *Environmental Health Perspectives* 113(8):969–77.

- Alonso-Magdalena P. et al., 2008. Pancreatic Insulin Content Regulation by the Estrogen Receptor ER Alpha. *PLoS One* 3(4):e2069.
- Alonso-Magdalena P., Morimoto S., Ripoll C., Fuentes E., Nadal A., 2006. The Estrogenic Effect of Bisphenol A Disrupts Pancreatic Beta-Cell Function in Vivo and Induces Insulin Resistance. *Environmental Health Perspectives* 114(1):106–12.
- ANSES, 2011. Rapport «Effets sanitaires du bisphénol A (BPA)» et «Connaissances relatives aux usages du bisphénol A»
- Asahi J. et al., 2010. Bisphenol A Induces Endoplasmic Reticulum Stress-Associated Apoptosis in Mouse Non-Parenchymal Hepatocytes. *Life Sciences* 87(13–14):431–38.
- Baillie-Hamilton, Paula F. 2002. “Chemical Toxins: A Hypothesis to Explain the Global Obesity Epidemic.” *The Journal of Alternative and Complementary Medicine* 8(2):185–92.
- Batista T.M. et al., 2012. Short-Term Treatment with Bisphenol-A Leads to Metabolic Abnormalities in Adult Male Mice. *PLoS One* 7(3):e33814.
- Batista T.M. et al., 2012. Short-Term Treatment with Bisphenol-A Leads to Metabolic Abnormalities in Adult Male Mice. *PLoS ONE* 7(3):e33814.
- Ben-jonathan N., Hugo E.R., Brandebourg T.D., 2010. Tissue : Implications for the Metabolic Syndrome. *Mol Cell Endocrinol* 304(513):49–54.
- Biedermann S., Tschudin P., Grob K., 2010. Transfer of Bisphenol A from Thermal Printer Paper to the Skin. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 398(1):571–76.
- Boucher J.G., Ahmed S., Atlas E., 2016. Bisphenol S Induces Adipogenesis in Primary Human Preadipocytes from Female Donors. *Endocrinology* 157(4):1397–1407.
- Brieno-Enriquez M.A. et al., 2012. Gene Expression Is Altered after Bisphenol A Exposure in Human Fetal Oocytes in Vitro. *Mol Hu, Reprod* 18(4):171–83.
- Calafat A.M. et al., 2005. Urinary Concentrations of Bisphenol A and 4-Nonylphenol in a Human Reference Population. *Environmental Health Perspectives* 113(4):391–95.
- Calafat A.M., Ye X., Wong L.Y., Reidy J.A., Needham L.L., 2008. Exposure of the U.S. Population to Bisphenol A and 4-Tertiary-Octylphenol: 2003–2004. *Environmental Health Perspectives* 116(1):39–44.
- Carwile J.L. et al., 2009. Polycarbonate Bottle Use and Urinary Bisphenol A Concentrations. *Environmental Health Perspectives* 117(9):1368–72.
- Carwile J.L., Michels K.B., 2011. Urinary Bisphenol A and Obesity: NHANES 2003–2006. *Environmental Research* 111(6):825–30.
- Charisiadis P. et al., 2018. Possible Obesogenic Effects of Bisphenols Accumulation in the Human Brain. *Scientific Reports* 8(1):1–10.
- Chevalier N. et al., 2012. GPR30, the Non-Classical Membrane G Protein Related Estrogen Receptor, Is Overexpressed in Human Seminoma and Promotes Seminoma Cell Proliferation. *PLoS One* 7(4): e34672.
- Dahlman-Wright K. et al., 2006. Estrogen Receptors. *Pharmacological Reviews* 58(4):773–81.
- Dekeyser J.G., Laurenzana E.M., Peterson E.C., Chen T., Omiecinski C.J., 2011. Selective Phthalate Activation of Naturally Occurring Human Constitutive Androstane Receptor Splice Variants and the Pregnane X Receptor. *Toxicol Sci* 120(2):381–91.
- Duan Y. et al., 2018. Association of Urinary Concentrations of Bisphenols with Type 2 Diabetes Mellitus: A Case-Control Study. *Environmental Pollution* 243(Pt B):1719–26.
- Fénichel P., Brucker-Davis F., Chevalier N., 2015. The History of Distilbène® (Diethylstilbestrol) Told to Grandchildren – the Transgenerational Effect. *Annales d’Endocrinologie* 76(3):253–59.
- Fernandez M.F. et al., 2007. Bisphenol-A and Chlorinated Derivatives in Adipose Tissue of Women. *Reproductive Toxicology* 24(2):259–64.
- Fu S. et al., 2011. Aberrant lipid metabolism disrupts calcium homeostasis causing liver endoplasmic reticulum stress in obesity. *Nature* 473(7348):528–31.
- Geens T., oeyens L., Covaci A., 2011. Are Potential Sources for Human Exposure to Bisphenol-A Overlooked? *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 214(5):339–47.
- Grün F., 2010. Obesogens. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes, and Obesity* 17(5):453–59.
- Hassan Z.K. et al., 2012. Bisphenol A Induces Hepatotoxicity through Oxidative Stress in Rat Model *Oxid Med Cell Longev* 2012: 194829.
- Huc L., Lemarié A., Guéraud F., Héliers-Toussaint C., 2012. Toxicology in Vitro Low Concentrations of Bisphenol A Induce Lipid Accumulation Mediated by the Production of Reactive Oxygen Species in the Mitochondria of HepG2 Cells. *Toxicology in Vitro* 26(5):709–17.

- Hugo E.R. et al., 2008. Bisphenol A at Environmentally Relevant Doses Inhibits Adiponectin Release from Human Adipose Tissue Explants and Adipocytes. *Environmental Health Perspectives* 116(12):1642–47.
- Hwang S., Lim J.E., Choi Y., Jee S.H., 2018. Bisphenol A Exposure and Type 2 Diabetes Mellitus Risk: A Meta-Analysis. *BMC Endocrine Disorders* 18(1):81.
- Ivry Del Moral L. et al., 2016. Obesogen Effects after Perinatal Exposure of 4,4'-Sulfonyldiphenol (Bisphenol S) in C57BL/6 Mice. *Toxicology* 357–358:11–20.
- Iwamuro S. Yamada M., Kato M., Kikuyama S., 2006. Effects of Bisphenol A on Thyroid Hormone-Dependent up-Regulation of Thyroid Hormone Receptor α and β and down-Regulation of Retinoid X Receptor γ in *Xenopus* Tail Culture. *Life Sci* 79:2165–71.
- Kidani T. et al., 2010. Bisphenol A Downregulates Akt Signaling and Inhibits Adiponectin Production and Secretion in 3T3-L1 Adipocytes. *J Atheroscler Thromb* 17(8): 834–43.
- Kim D.K. et al., 2011. “Estrogen-related receptor gamma (ERRgamma) is a novel transcriptional regulator of phosphatidic acid phosphatase, LIPIN1, and inhibits hepatic insulin signaling.” *J Biol Chem* 286(44): 38035-42.
- Kim D.K. et al., 2012. Orphan Nuclear Receptor Estrogen-Related Receptor g (ERR g) Is Key Regulator of Hepatic Gluconeogenesis. *J Biol Chem* 287(26):21628–39.
- Kitamura S. et al., 2005. Comparative Study of the Endocrine-Disrupting Activity of Bisphenol A and 19 Related Compounds. *Toxicol Sci* 84(2):249–59.
- Kubo M., Ijichi N., Ikeda K., Horie-Inoue K., 2009. Modulation of adipogenesis-related gene expression by estrogen-related receptor gamma during adipocytic differentiation. *Biochim Biophys Acta* 1789(2): 71-7.
- Lang I.A. et al., 2008. Association of Urinary Bisphenol A Concentration With Medical Disorders and Laboratory Abnormalities in Adults. *JAMA* 300(11):1303.
- Liao C., Kannan K., 2011. High Levels of Bisphenol A in Paper Currencies from Several Countries, and Implications for Dermal Exposure. *Environmental Science & Technology* 45(16):6761–68.
- Linehan C., Gupta S., Samali A., Connor L.O., 2012. Bisphenol A-Mediated Suppression of LPL Gene Expression Inhibits Triglyceride Accumulation during Adipogenic Differentiation of Human Adult Stem Cells. *PLoS One* 7(5): e36109.
- Liu X., Ayami Matsushima A., Hiroyuki Okada H., Shimohigashi Y., 2010. “Distinction of the binding modes for human nuclear receptor ERRgamma between bisphenol A and 4-hydroxytamoxifen.” *J Biochem* 148(2): 247-54.
- Makaji E., Raha S., Wade M.G., Holloway A.C., 2011. Effect of Environmental Contaminants on Beta Cell Function. *International Journal of Toxicology* 30(4):410–18.
- Marino M., Ascenzi P., Acconcia F., 2006. S -Palmitoylation Modulates Estrogen Receptor Alpha Localization and Functions. *Steroids* 71(4): 298-303.
- Marmugi A. et al., 2014. Adverse Effects of Long-Term Exposure to Bisphenol A during Adulthood Leading to Hyperglycaemia and Hypercholesterolemia in Mice. *Toxicology* 325:133–43.
- Marmugi A. et al., 2012. Low Doses of Bisphenol a Induce Gene Expression Related to Lipid Synthesis and Trigger Triglyceride Accumulation in Adult Mouse Liver. *Hepatology* 55(2):395–407.
- Masuno H. et al., 2002. Bisphenol A in Combination with Insulin Can Accelerate the Conversion of 3T3-L1 Fibroblasts to Adipocytes. *J Lipid Res* 43(5): 676-84.
- Melzer D., Rice N.E., Lewis C., Henley W.E., Galloway T.S., 2010. Association of Urinary Bisphenol A Concentration with Heart Disease: Evidence from NHANES 2003/06. *PLoS ONE* 5(1):e8673.
- La Merrill M., Birnbaum L.S., 2011. Childhood Obesity and Environmental Chemicals. *The Mount Sinai Journal of Medicine, New York* 78(1):22–48.
- Miyawak J., Sakayama K., Kato H., Yamamoto H., Masuno H., 2007. Perinatal and Postnatal Exposure to Bisphenol a Increases Adipose Tissue Mass and Serum Cholesterol Level in Mice. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* 14(5):245–52.
- Moon M.K. et al., 2012. Bisphenol A Impairs Mitochondrial Function in the Liver at Doses below the No Observed Adverse Effect Level. *J Korean Med Sci* 27(6): 644-52.
- Moriyama K. et al., 2002. Thyroid Hormone Action Is Disrupted by Bisphenol A as an Antagonist. *J Clin Endocrinol Metab* 87(11): 5185-90.
- Neel B.A., Sargis R.M., 2011. The Paradox of Progress: Environmental Disruption of Metabolism and the Diabetes Epidemic. *Diabetes* 60(7):1838–48.
- Okada H. et al., 2008. Direct Evidence Revealing Structural Elements Essential for the High Binding Ability of Bisphenol A to Human Estrogen-Related Receptor- γ . *Environ Health Perspect* 116(1): 32-8.
- Paris F., Balaguer P., Lacoste C., Nicolas J.C., Sultan C., 2002. Phenylphenols, Bisphenols, Bisphenol-A and 4-Tert-Octylphenol Exhibit a and b Estrogen Activities and Antiandrogen Activity. In Reporter Cell Lines. *Mol Cell Endocrinol* 193(1-2): 43-9.

- Richter C.A. et al., 2007. In Vivo Effects of Bisphenol A in Laboratory Rodent Studies. *Reproductive Toxicology* 24(2):199–224.
- Rochester J.R., 2013. Bisphenol A and Human Health: A Review of the Literature. *Reproductive Toxicology* 42:132–55.
- Ropero A.B., Pang Y., Alonso-Magdalena P., Thomas P., Nadal A., 2012. Role of ER β and GPR30 in the Endocrine Pancreas: A Matter of Estrogen Dose. *Steroids* 77(10):951–58.
- Rubin B.S., Murray M.K., Damassa D.A., King J.C. Soto, A.M., 2001. Perinatal Exposure to Low Doses of Bisphenol A Affects Body Weight, Patterns of Estrous Cyclicity, and Plasma LH Levels. *Environmental Health Perspectives* 109(7):675–80.
- Rudel R.A. et al., 2011. Food Packaging and Bisphenol A and Bis(2-Ethylhexyl) Phthalate Exposure: Findings from a Dietary Intervention. *Environmental Health Perspectives* 119(7):914–20.
- Vom Saal F et al., 2005. The Importance of Appropriate Controls, Animal Feed, and Animal Models in Interpreting Results from Low-Dose Studies of Bisphenol A. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology* 73(3):140–45.
- Vom Saal F, Hughes C., 2005. An Extensive New Literature Concerning Low-Dose Effects of Bisphenol A Shows the Need for a New Risk Assessment. *Environmental Health Perspectives* 113(8):926–33.
- Sakurai K. et al., 2004. Bisphenol A Affects Glucose Transport in Mouse 3T3-F442A Adipocytes. *Br J Pharmacol* 141(2): 209-14.
- Sargis R.M., Johnson D.N., Choudhury R.A., Brady M.J., 2009. Environmental Endocrine Disruptors Promote Adipogenesis in the 3T3-L1 Cell Line through Glucocorticoid Receptor Activation. *Obesity* 18(7):1283–88.
- Shankar A., S. Teppala, 2011. Relationship between Urinary Bisphenol A Levels and Diabetes Mellitus. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 96(12):3822–26.
- Sharma G., Prossnitz E.R., 2011. Mechanisms of Estradiol-Induced Insulin Secretion by the G Protein-Coupled Estrogen Receptor GPR30/GPER in Pancreatic β -Cells. *Endocrinology* 152(8):3030–39.
- Sohoni, P., Sumpter J.P., 1998. Several Environmental Oestrogens Are Also Anti-Androgens. *J Endocrinol* 158(3): 327-39.
- Somm E. et al., 2009. Perinatal Exposure to Bisphenol A Alters Early Adipogenesis in the Rat. *Environmental Health Perspectives* 117(10):1549–55.
- Soriano S. et al., 2012. Rapid Insulinotropic Action of Low Doses of Bisphenol-A on Mouse and Human Islets of Langerhans: Role of Estrogen Receptor β . *PLoS ONE* 7(2): e31109.
- Sui Y. et al., 2012. Bisphenol A and Its Analogues Activate Human Pregnane X Receptor. *Environ Health Perspect* 120(3): 399-405.
- Tabb M.M. et al., 2004. "Highly Chlorinated PCBs Inhibit the Human Xenobiotic Response Mediated by the Steroid and Xenobiotic Receptor (SXR). *Environ Health Perspect* 112(2): 163-9.
- Takayanagi S. et al., 2006. Endocrine Disruptor Bisphenol A Strongly Binds to Human Estrogen-Related Receptor γ (ERR γ) with High Constitutive Activity. *Toxicol Lett* 167(2): 95-105.
- Takeuchi T., Tsutsumi O., Ikezaki Y., Takai Y., Taketani Y., 2004. Positive Relationship between Androgen and the Endocrine Disruptor, Bisphenol A, in Normal Women and Women with Ovarian Dysfunction. *Endocrine Journal* 51(2):165–69.
- Thomas, Peter and Jing Dong. 2006. Binding and Activation of the Seven-Transmembrane Estrogen Receptor GPR30 by Environmental Estrogens: A Potential Novel Mechanism of Endocrine Disruption. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 102(1–5 SPEC. ISS.):175–79.
- Trasande, Leonardo, Teresa M. Attina, and Jan Blustein. 2012. "Association Between Urinary Bisphenol A Concentration and Obesity Prevalence in Children and Adolescents." *JAMA* 308(11):1113.
- Vanacker, Jean-marc, Katarina Pettersson, Jan-åke Gustafsson, and Vincent Laudet. 1999. Transcriptional Targets Shared by Estrogen Receptor- Related Receptors (ERRs) and Estrogen Receptor (ER) α , but Not by ER β . *EMBO J* 18(15): 4270-9.
- Vandenberg, Laura N., Russ Hauser, Michele Marcus, Nicolas Olea, and Wade V. Welshons. 2007. Human Exposure to Bisphenol A (BPA). *Reproductive Toxicology* 24(2):139–77.
- Wada, Koichiro, Hirotsada Sakamoto, Kenji Nishikawa, Satoru Sakuma, and Atsushi Nakajima. 2007. Life style-related diseases of the digestive system: endocrine disruptors stimulate lipid accumulation in target cells related to metabolic syndrome. *J Pharmacol Sci* 105(2): 133-7.
- Wang, Helen H., Min Liu, Deborah J. Clegg, Piero Portincasa, and David Q. Wang. 2009. New Insights into the Molecular Mechanisms Underlying Effects of Estrogen on Cholesterol Gallstone Formation. *Biochim Biophys Acta* 1791(11): 1037-47.
- Watson, Cheryl S., Yow-jiun Jeng, and Jutatip Guptarak. 2011. Endocrine Disruption via Estrogen Receptors That Participate in Nongenomic Signaling Pathways. *J Steroid Biochem Mol Biol* 127(1-2): 44-50.
- Watson, Cheryl S., Yow-jiun Jeng, and Mikhail Y. Kochukov. 2010. "Nongenomic Signaling Pathways of Estrogen Toxicity. *Toxicol Sci* 115(1): 1-11.
- Wei, Jie et al. 2011. "Perinatal Exposure to Bisphenol A at Reference Dose Predisposes Offspring to Metabolic Syndrome in Adult Rats on a High-Fat Diet." *Endocrinology* 152(8):3049–61.

- Welshons, Wade V, Susan C. Nagel, and Frederick S. vom Saal. 2006. Large Effects from Small Exposures. III. Endocrine Mechanisms Mediating Effects of Bisphenol A at Levels of Human Exposure. *Endocrinology* 147(6 Suppl):S56-69.
- Zalko, Daniel, Carine Jacques, H el ene Duplan, Sandrine Bruel, and Elisabeth Perdu. 2011. Viable Skin Efficiently Absorbs and Metabolizes Bisphenol A. *Chemosphere* 82(3):424-30.
- Zhao, Fei, Hongfang Wang, et al. 2018. Impairment of Bisphenol F on the Glucose Metabolism of Zebrafish Larvae. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 165:386-92.
- Zhao, Fei, Guobin Jiang, Penghao Wei, Hongfang Wang, and Shaoguo Ru. 2018. Bisphenol S Exposure Impairs Glucose Homeostasis in Male Zebrafish (*Danio Rerio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 147:794-802.
- Zoeller, R. Thomas. 2005. Environmental Chemicals as Thyroid Hormone Analogues : New Studies Indicate That Thyroid Hormone Receptors Are Targets of Industrial Chemicals? *Mol Cell Endocrinol* 242:10-15.

LES COMPOSÉS NÉOFORMÉS TOXIQUES ET LEUR REMÉDIATION - FOCUS SUR LES PRODUITS CARNÉS

Meurillon M. ¹ et Engel E. ¹

¹ INRA UR370 QuaPA, Equipe Microcontaminants, Arômes et Sciences Séparatives,
F-63122 Saint-Genès-Champanelle

Correspondance : erwan.engel@inra.fr

RÉSUMÉ

Les procédés de transformation induisent des réactions chimiques au sein des aliments pouvant amener à la formation de composés néoformés toxiques. Ces néoformations qui dépendent de plusieurs facteurs incluant la composition de la matière première et les conditions de procédé peuvent impacter la qualité sanitaire des aliments. Bien que les composés néoformés toxiques soient généralement retrouvés à l'état de trace dans les aliments, leur consommation régulière tout au long de la vie pourrait contribuer à terme au développement de certaines pathologies (diabète, cancers, troubles neurologiques...). Souvent générés par le consommateur lors de la préparation domestique de ses aliments, l'évaluation des niveaux d'exposition et donc des risques liés à leur ingestion est complexe. A l'heure actuelle, très peu de composés néoformés sont réglementés dans notre alimentation. Les progrès récents en matière de techniques d'analyse et de chimie réactionnelle permettent aujourd'hui une meilleure connaissance de ces composés, de leurs conditions de formation et ouvrent la voie à des solutions pour y remédier.

Mots-clés : Composés néoformés toxiques, Produits carnés, Procédés de transformation, Remédiation, Méthodes d'analyse.

ABSTRACT: Process-induced toxicants and their mitigation – A focus on meat products

Transformation processes induce chemical reactions in foods that can lead to the formation of process-induced toxicants which will in turn impact the food safety. These reactions are dependent on several factors including the composition of the raw material and the conditions of process. Although the process-induced toxicants are generally produced at trace level, the frequent exposure of consumer throughout his life, may contribute to the development of certain pathologies including diabetes, cancer and neurological disorders. In most cases, they are generated by the consumer when he prepares his food, which makes it difficult to assess exposure levels and the risks associated with their ingestion. At present, very few process-induced toxicants are regulated in our diet. Recent advances in analytical techniques and reaction chemistry now allow a better knowledge of these compounds, their conditions of formation and pave the way to solutions to mitigate them.

Keywords: Process-induced toxicants, Proteinaceous food, Transformation processes, Mitigation, analytical methods.

INTRODUCTION

L'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) met en garde sur le fait qu'au cours du processus de transformation technologique et/ou de préparations culinaires industrielles ou ménagères des denrées alimentaires, des réactions chimiques peuvent se produire et provoquer la formation de certains composés indésirables. Ces substances sont qualifiées de composés néoformés; elles peuvent se former au cours de traitements thermiques, au cours des procédés de fermentation ou au cours de différentes étapes de conservation (ANSES, 2015).

La néoformation de composés toxiques (dont plusieurs exemples sont présentés sur la Figure 1) est conditionnée principalement par le type de matrice alimentaire et le procédé de fabrication; les produits riches en carbohydrate induisant la formation d'acrylamide et d'hydroxyméthylfurfural, les produits carnés qui lors des procédés de cuisson ou de fumage vont se charger en amines aromatiques hétérocycliques (AAHs), en hydrocarbures polycycliques aromatiques (HAPs) et en composés *N*-nitrosés ou encore les huiles via la formation de monochloropropane diol et de ses dérivés.

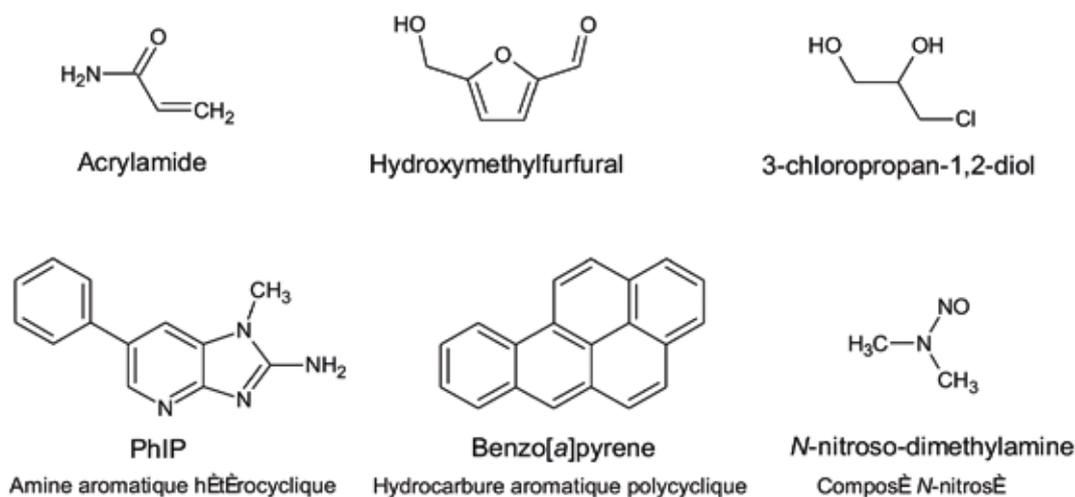


Figure 1 : Exemple de produits néoformés lors des procédés de transformation des aliments

L'exposition du consommateur aux substances néoformées via l'alimentation peut éventuellement être associée à des effets indésirables pouvant se manifester à plus ou moins long terme (exposition chronique à de faibles doses). Cependant le processus d'évaluation des risques liés à ces substances néoformés présente deux difficultés majeures : 1/ leur détection, identification et quantification dans les denrées alimentaires et leur cinétique de formation en milieu complexe ; 2/ la détermination de leur impact toxicologique à considérer au sein même d'une matrice alimentaire dont la composition évolue avec les traitements concernés (ANSES, 2015).

Les produits carnés qui nécessitent des étapes de transformation (telles que la cuisson ou le fumage) avant d'être consommés, notamment pour réduire les risques microbiologiques ou améliorer leur palatabilité, sont particulièrement impactés par la formation de substances néoformées. Une récente monographie du Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) a ainsi classé la consommation de viande rouge comme probablement cancérigène pour l'homme et celle de charcuterie comme cancérigène pour l'homme (Bouvard et al., 2015 ; IARC, 2018) en lien notamment avec la présence de certains composés néoformés produits lors des procédés de transformation.

Cet article propose de traiter les néoformations de composés toxiques dans les produits carnés. Les différents composés seront d'abord décrits (formation, toxicité, exposition, risque) puis une seconde partie s'intéressera aux moyens de remédiation pour en diminuer l'impact sur la santé du consommateur. Enfin, la dernière partie traitera des différentes stratégies possibles pour leur détection dans les aliments.

1. Formation, toxicité, exposition et risque relatifs aux principaux composés néoformés des produits carnés

1.1 Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs)

Il s'agit de composés appartenant à une sous famille des hydrocarbures aromatiques dont la structure comprend au moins deux cycles aromatiques condensés. La consommation de produits carnés fumés est la principale source d'exposition aux HAPs qui sont formés par combustion incomplète du bois transféré dans l'aliment lors de son exposition aux fumées. Les HAPs sont également présents dans les viandes grillées (Alomirah et al., 2011 ; Kazerouni et al., 2001) car ils peuvent également être générés par pyrolyse de matières organiques, par contact direct de gras avec une flamme ou par combustion incomplète de charbon.

Plus de 100 HAPs ont été identifiés, parmi lesquels 15 ont été classés génotoxiques ou cancérigènes (EFSA, 200; IARC, 2010) et très probablement neurotoxiques (Crépeaux et al., 2013). Ils sont donc surveillés par les agences sanitaires (Schroeder, 2010). Parmi eux, le benzo[a]pyrène est le plus toxique de par sa capacité à former des adduits avec l'ADN, ce qui peut induire des effets mutagènes et cancérigènes (IARC, 2010). Il a donc pendant longtemps été utilisé comme seul marqueur de la présence des HAPs. Cependant il a été montré récemment que son seul suivi était insuffisant et qu'il fallait également considérer la somme de benzo[a]pyrène, benz[a]anthracène, benzo[b]fluoranthène et chrysène (HAP4) (European Commission, 2011). Des niveaux maximaux réglementaires ont été établis notamment pour les viandes et produits à base de viande traités thermiquement vendus au consommateur final : 5 µg/kg pour le benzo[a]pyrène et 50 µg/kg pour les 4 HAPs. Pour les viandes fumées et produits de viande fumés, les niveaux maximaux ont été fixés à 2 µg/kg pour le benzo[a]pyrène et 12 µg/kg pour les 4 HAPs.

Dans son étude de l'alimentation totale publiée en 2011 (ANSES, 2011), l'ANSES a établi une exposition journalière moyenne de la population française à la somme des 4 HAPs à 1,48 ng/kg poids corporel/jour chez les adultes et à 2,26 ng/kg poids corporel/jour chez les enfants. Ces expositions sont moins élevées que celles reportées par l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA, 2008) qui annonce une exposition moyenne journalière de la population européenne adulte à la somme des 4 HAPs de 19,5 ng/kg poids corporel/jour. Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que les groupes d'aliments présentés dans le rapport de l'EFSA (issues d'échantillons provenant de plans aléatoires ou ciblés) sont des produits plus susceptibles de contenir des HAPs (viandes et poissons fumés) que les aliments analysés dans l'étude menées par l'ANSES.

L'évaluation des risques liés à une substance donnée nécessite à la fois d'en évaluer les dangers (données de toxicité) et d'en connaître les niveaux d'exposition. A l'heure actuelle, la méthode préconisée pour évaluer le risque repose sur la détermination d'une marge d'exposition. La marge d'exposition est un outil développé par l'EFSA qui est utilisé par les évaluateurs du risque pour étudier les possibles problèmes de sécurité sanitaire découlant de la présence dans l'alimentation humaine et animale de substances qui à la fois sont génotoxiques (susceptibles d'endommager l'ADN) et cancérigènes. La marge d'exposition (MOE) est un rapport entre deux facteurs qui per-

met d'évaluer, pour une population donnée, la dose à laquelle est observé un effet indésirable faible mais mesurable associé à la substance, et le niveau d'exposition effectif à cette substance. Dans son avis de 2005, le comité scientifique de l'EFSA a indiqué qu'en général une marge d'exposition égale ou supérieure à 10 000, lorsqu'elle est basée sur la «limite inférieure de la dose de référence» (BMDL) obtenue lors d'une étude menée chez l'animal, susciterait peu de préoccupations du point de vue de la santé publique (EFSA 2005).

Ainsi la marge d'exposition pour la somme des 4 HAPs dans le cas d'une exposition moyenne s'élève à 230 041 pour les adultes français et 150 509 pour les enfants français (ANSES, 2011). Les résultats indiquent que le risque lié à l'exposition aux HAPs (hors pratiques particulières comme la cuisson au barbecue) peut être écarté pour la population. Cependant, certains HAPs comme le benzo[a]pyrène, étant cancérigènes génotoxiques sans seuil, le risque même très faible ne peut être considéré comme nul (ANSES, 2011).

1.2 Les amines aromatiques hétérocycliques (AAHs)

Les AAHs, composés néoformés lors des procédés thermiques, ont été découvertes il y a une quarantaine d'année. A ce jour, plus de 25 AAHs ont été identifiées dans les viandes cuites, qu'elles soient rouges ou issues de volailles ou de poissons (Sugimura, et al., 2004), ainsi que dans les fumées de cigarette ou les gaz d'échappement. La consommation de protéines animales est la principale source d'exposition pour l'homme. Le niveau d'exposition dépend principalement du type de viande/poisson ainsi que des conditions de cuisson (Skog, et al., 2000). Les AAHs sont divisées en 2 grandes familles : les AAHs pyrolytiques et les AAHs thermiques ou aminoimidazoazaarènes. Les AAHs pyrolytiques sont formées à haute température (souvent supérieure à 250°C) et leurs teneurs dans les produits carnés restent faibles (Skog, et al., 1998). Les AAHs thermiques ou aminoimidazoazaarènes sont formées par réaction de Maillard dans des conditions standards de cuisson (150-200°C). Ainsi une AAH donnée peut être formée en quantité appréciable dès 130°C (Turesky et al., 2005) par réaction entre la créatine, un acide aminé libre et un sucre (hexose) (Skog, et al., 1998 ; Murkovic, 2004). Cependant, les mécanismes de formation ne sont pas totalement connus hormis pour le PhIP (Zamora, et al., 2014).

Les AAHs sont mutagènes et génotoxiques (IARC, 1993). En effet, même à de très faibles concentrations, elles induisent des dommages génétiques en formant des adduits avec l'ADN. Certaines d'entre elles présentent même une activité mutagène supérieure à celle du benzo[a]pyrène. Le CIRC a ainsi classé MeIQ, MeIQx, PhIP, AaC, MeAaC, Trp-P-1, Trp-P-2 and Glu-P-1 comme peut-être cancérigènes (groupe 2B) et IQ comme probablement cancérigène (groupe 2A) pour l'homme (IARC, 1993). Ces résultats sont basés sur la preuve suffisante de la carcinogénicité de ces composés et sur les données de génotoxicité obtenues lors d'études à long terme sur l'alimentation des animaux (IARC, 1993).

Les données d'exposition sont très variables d'un pays à l'autre en fonction des habitudes de consommation des produits carnés (Tableau 1). L'exposition moyenne en Europe est estimée autour de 6 ng/kg de poids corporel/jour (Zimmerli et al., 2001).

Tableau 1 : Exposition aux AAHs (ng/jour par personne) mentionnée dans la littérature

AAHs total	PhIP	MeIQx	DiMeIQx	Aliments analysés et AAHs dosées	Référence
	100-13 800	100-1 300		Viande et poisson cuits	(Augustsson et al., 1997)
800-8 400				Viande et poisson cuits	(Augustsson et al., 1997)
				AAHs non spécifiés	
40-7 000				Viande et poisson cuits & jus de viande	(Augustsson et al., 1997)
				Σ (IQ, MeIQ, MeIQx, DiMeIQx, PhIP)	
<500-4 000				Viande et poisson cuits & jus de viande	(Augustsson et al., 1997)
				Σ (MeIQx, DiMeIQx, PhIP)	
1 820				Σ (IQ, MeIQx, DiMeIQx, PhIP, AaC)	(Augustsson et al., 1997)
160	72	72	16	Viande et poisson cuits & jus de viande	(Augustsson et al., 1997)
				Σ (IQ, MeIQ, MeIQx, DiMeIQx, PhIP)	
31	16,8	9,5	1,7	Viande cuite	(Rohmann et al., 2007)
397	156	85	39	Viande cuite et jus de viande	(Zimmerli, et al., 2001)
				Σ (IQ, MeIQ, MeIQx, DiMeIQx, PhIP)	

IQ = 2-amino-3-méthyl-imidazo[4,5-f]-quinoline ; MeIQ = 2-amino-3,4-diméthyl-imidazo[4,5-f]-quinoline ; MeIQx = 2-amino-3,4-diméthyl-imidazo[4,5-f]-quinoxaline ; DiMeIQx = 2-amino-3,4,8-triméthyl-imidazo[4,5-f]-quinoxaline ; PhIP = 2-amino-1-méthyl-6-phénylimidazo[4,5-b]-pyridine, AaC = 2-amino-9H-pyrido[2,3-b]indole. Teneurs données en ng/jour/pers

Des travaux de la littérature évaluent la marge d'exposition pour le PhIP entre 80 000 et 100 000 en fonction du type de tumeurs considérées (Benford et al., 2010). Si cette valeur de marge d'exposition aux AAHs ne semble pas préoccupante car supérieure à 10 000, et que les teneurs en AAHs dans les produits commerciaux prêts à consommer sont faibles, il reste très difficile d'évaluer le risque lié aux pratiques domestiques. De plus, les autorités sanitaires de la plupart des pays occidentaux recommandent de limiter la présence de ces AAHs car elles pourraient induire des mutations et ainsi agir comme promoteurs de lésions cancéreuses. Le rapport du CIRC sur la consommation de viandes rouges et transformées pointe notamment ces composés néoformés comme potentiels responsables de la carcinogénicité observée (IARC, 2018).

1.3 Les composés N-nitrosés

Les composés N-nitrosés sont des composés néoformés qui sont divisés en deux groupes : les N-nitrosamines, plutôt stables que l'on retrouve comme contaminants alimentaires, et les N-nitrosamides relativement instables. Dans les produits carnés, les composés N-nitrosés présentent la particularité de pouvoir être générés (i) de manière exogène dans l'aliment lui-même, via l'action des nitrites en conditions acides sur les amines secondaires pendant la préparation et/ou pendant la conservation des produits (Honikel, 2008), ou (ii) de manière endogène lors de la phase gastrique de la digestion (Tricker, 1997). L'efficacité de la N-nitrosation, réaction biochimique à l'origine de la formation des composés N-nitrosés, dépend de l'abondance des précurseurs (nitrites, amines secondaires), des paramètres physicochimiques favorables (températures élevées et bas pH) et/ou de la présence de catalyseurs chimiques (métaux de transition). Bien qu'ils ne soient pas les plus gros pourvoyeurs de nitrites alimentaires, les produits carnés sont largement impliqués dans la N-nitrosation exogène ou endogène car ils sont une excellente source d'amines secondaires et renferment en quantité importante des métaux de transition catalyseurs comme le fer ou le cuivre. Leur cuisson, notamment au-delà de 130°C, favorise aussi la N-nitrosation. Avec les produits laitiers et les boissons alcoolisées telles que la bière, les produits carnés sont décrits comme les principales sources de composés N-nitrosés exogènes (Gangolli et al., 1994). Des valeurs moyennes de 118 mg/kg en nitrosamines non volatiles

totales ont été rapportées récemment dans des produits de charcuterie (Herrmann et al., 2015), les quantités de nitrosamines volatiles étaient, elles, beaucoup plus faibles (0,8 mg/kg). La contribution endogène à l'apport total en composés *N*-nitrosés serait beaucoup plus importante, l'estomac étant un milieu propice à la *N*-nitrosation. Ainsi il a été montré que 45 à 75% de l'exposition humaine aux nitrosamines proviendrait de leur formation *in vivo* (Tricker, 1997).

Le CIRC a classifié un grand nombre de ces composés *N*-nitrosés comme probablement (groupe 2A) ou peut-être (groupe 2B) cancérigènes (IARC, 1977, 1998). En effet, la plupart des composés *N*-nitrosés sont des composés précarcinogènes qui, après activation métabolique, vont pouvoir réagir sur les centres nucléophiles de certains constituants cellulaires tels que les protéines, l'ARN ou l'ADN et induire des mutations. La *N*-nitrosodiméthylamine (NDMA) est elle classifiée comme cancérigène avérée pour l'homme (groupe 1).

Les données d'exposition aux composés *N*-nitrosés sont très variables en fonction des habitudes alimentaires des populations étudiées (Tableau 2). L'exposition à la NDMA en France serait de 0,25 µg/personne/jour dont 0,06 µg proviendrait des charcuteries, 0,052 µg des poissons fumés et 0,026 µg des boissons alcoolisées, particulièrement la bière (Cornee et al., 1992 ; Gangolli et al., 1994).

Tableau 2 : Exposition aux composés *N*-nitrosés (µg/personne/jour) mentionnée dans la littérature

Voie d'exposition	Ingestion	Nitrosamines dosées	Remarque	Référence
Formé de manière endogène	1-1 000	NPRO ^a , NPIP ^b , NDMA	Grande variation interindividuelle	(Bartsch & Montesano, 1984)
Alimentation	0,5-1,2	NDMA	Variable, en fonction de l'aliment	(Bartsch & Montesano, 1984)
	0,1-0,2	NPYR ^c		(Jakszyn et al., 2006)
	<1	NDMA	sur base de la base de données Jakszyn et al. (2004)	(WHO, 2008)
	0,3-0,7	NDMA	pour une personne de 60kg	(Tricker, 1997)
Eau	0,02-0,06	NDMA	pour une personne de 60kg	(WHO, 2008)
	20-80		0,79 µmol par jour	(Tricker, 1997)
Exposition professionnelle			0,15-0,30 µmol par jour	(Tricker, 1997)
Cigarettes	3,4		0,02 µmol par jour	(Tricker, 1997)
Autres ^d	0,1		0,001 µmol par jour	(Tricker, 1997)

^a NPRO = *N*-nitrosoproline, excrétion de NPRO dans l'urine comme indicateur de nitrosation endogène

^b NPIP = *N*-nitrosopiperidine

^c NPYR = *N*-nitrosopyrrolidine

^d produits pharmaceutiques, cosmétiques, atmosphère intérieure / extérieure

Si la marge d'exposition aux composés *N*-nitrosés n'est pas préoccupante en elle-même car supérieure à 10 000, le cas de la formation endogène reste problématique. Ainsi le rapport du CIRC sur la consommation de viandes rouges et transformées souligne qu'il y a une forte évidence que les composés *N*-nitrosés contribuent aux mécanismes de cancérogénèse associés à la consommation de viande rouge (IARC, 2018). Sur la base d'études d'intervention prospectives, ce rapport conclut à une formation de composés *N*-nitrosés dans l'estomac, susceptibles ensuite de former des adduits mutagènes avec l'ADN.

2. Remédiation des composés néoformés le long de la chaîne d'élaboration des produits carnés

Les composés néoformés toxiques peuvent être générés lors des étapes de transformation, d'emballage, de stockage et de digestion des aliments. Dans le cas des produits carnés, les néoformations vont résulter essentiellement des traitements thermiques, du fumage ou des transformations subies par l'aliment au cours de sa digestion (Stadler et Lineback, 2009). Les AAHs, issues pour la plupart de la réaction de Maillard, vont être générées majoritairement lors du chauffage des produits carnés. Les HAPs sont formés soit par le transfert à la surface des aliments de la fumée produite par la combustion incomplète du bois, soit lors de la pyrolyse de matières organiques (telles que les graisses) à des températures supérieures à 200°C ou encore par contact direct du gras avec une flamme. Les procédés de fumage ainsi que les procédés thermiques impliquant une cuisson intense, tels que le barbecue, sont donc les plus impliqués dans la formation de ces composés néoformés. Les composés *N*-nitrosés vont être générés dans les produits de charcuterie traités au nitrite mais également lors du processus de digestion gastrique (voie endogène).

À l'heure actuelle, seuls certains de ces composés néoformés font l'objet de mesures réglementaires : c'est le cas du monochloropropane diol et du benzo[*a*]pyrène (BaP) mentionnés dans le règlement (CE) n°1881/2006. Il n'existe pas de teneurs maximales réglementaires pour l'acrylamide mais la Commission Européenne a recommandé d'atténuer les teneurs en acrylamide dans les denrées alimentaires (recommandations 2010/307/UE) et a fixé des valeurs de référence (règlement 2017/2158 UE). Il n'existe pas à ce jour de mesures réglementaires pour les AAHs car elles sont majoritairement formées par les pratiques domestiques. Quant aux composés *N*-nitrosés, ils ne sont pas réglementés en tant que tels, mais une dose journalière admissible a été établie pour le nitrite et le nitrate, précurseurs de ces composés dans le cas des produits de charcuteries (EFSA, 2017).

Les autorités sanitaires préconisent de diminuer la teneur en composés néoformés dans les aliments (ANSES, 2015). Pour atteindre cet objectif, différents leviers peuvent être actionnés : les matières premières, les procédés et la formulation.

2.1 Les matières premières

Une des techniques pour limiter la formation de composés néoformés est d'impacter sur les précurseurs des réactions mises en jeu directement au sein des matières premières.

Une étude a montré que l'utilisation d'une certaine race de porcs portant un allèle particulier permettait de réduire de moitié la quantité de AAHs formées à la cuisson du fait de la forte concentration en glycogène dans les muscles (Olsson et al., 2002). Il serait également envisageable de pouvoir moduler les niveaux de néoformation via une alimentation spécifique des animaux d'élevage. En se basant sur le rôle inhibiteur de la vitamine E sur la formation d'AAHs, des premiers travaux se sont intéressés à l'effet d'une alimentation bovine enrichie en vitamine E sur la réduction de la néoformation de AAHs (Ruan et al., 2014). Une augmentation significative en α -tocopherol (une des formes de la vitamine E) dans la viande a été observée mais en revanche aucune diminution significative en AAHs n'a été mise en évidence. Les auteurs ont supposé que ce dernier résultat pouvait s'expliquer notamment par le type de muscle choisi.

Cette voie de remédiation via les matières premières nécessite de jouer sur des leviers zootechniques (alimentation spécifique des animaux d'élevage) ou génétiques (utilisation de races présentant des particularités génétiques propices à une diminution de certains composés néoformés). Relativement lourde à mettre en place, elle n'est donc envisageable que sur des productions industrielles.

2.2 Les procédés

Une autre méthode de remédiation est d'impacter directement sur le procédé mis en cause pour limiter la formation des composés néoformés.

De nombreuses revues scientifiques ont traité des méthodes de cuisson pour influencer sur le niveau des AAHs (Alaejos et Afonso, 2011). Il a ainsi été montré que des méthodes de cuisson intense telles que le barbecue ou la cuisson au grill généraient une forte proportion de AAHs. De même plus la durée de cuisson est longue et plus la température est importante, plus il y aura néoformation de AAHs. Par exemple, dans le cas d'une cuisson à la plancha de steak haché à une température de 190°C, il a été montré que la quantité de PhIP formé s'élevait à 0,15 ng/g de viande cuite après 4 min de cuisson et à 9,8 ng/g de viande cuite après 10 min de cuisson (Knize et al., 1994). Les mêmes travaux ont également étudié l'impact de la température de cuisson : la quantité de PhIP générée après 10 min de cuisson passait de 1,8 ng/g de viande cuite à 150°C à 9,8 ng/g de viande cuite à 190°C et à 32 ng/g de viande cuite à 230°C. Une méthode pour limiter la néoformation de composés toxiques est donc d'utiliser des méthodes de cuisson plus douces (cuisson à basse température) ou à diminuer les temps de cuisson, dans les limites imposées par la sécurité microbiologique.

Dans le cas des produits fumés qui pourraient être contaminés par des HAPs formés lors du procédé, des méthodes de fumage alternatives ont été développées pour limiter les risques et ainsi ne pas dépasser les limites imposées par la réglementation européenne de 2 µg/kg pour le benzo[a]pyrène et 12 µg/kg pour les 4 HAPs. (European Commission, 2011). A l'heure actuelle l'utilisation d'arômes de fumée liquides (Simko, 2005) permet de reproduire l'arôme recherché sans utiliser de fumeur et présente donc une alternative intéressante au procédé de fumage traditionnel.

Ces méthodes sont principalement d'usage industriel. Cependant certaines recommandations sont également diffusées pour faire connaître les bonnes pratiques de cuisson aux consommateurs. L'ANSES a ainsi publié un document faisant des recommandations aux consommateurs pour éviter la formation de composés chimiques indésirables lors de la cuisson domestique au barbecue (<https://www.anses.fr/fr/system/files/ANSES-Ft-RecosBarbecue.pdf>).

2.3 La formulation

Une autre méthode de remédiation passe par la formulation, soit via l'ajout d'ingrédients antioxydants à la matière première lors de la fabrication du produit alimentaire par l'industriel, soit par l'apport de ces antioxydants via un régime alimentaire adapté (au niveau du plat ou même du repas complet). Ces antioxydants vont pouvoir agir à trois niveaux pour réduire l'impact des néoformés sur la santé humaine : 1/ limiter leur néoformation exogène directement, 2/ réduire leur néoformation endogène et 3/ moduler leur activation métabolique (Meurillon et Engel, 2016). Quelques exemples pratiques de formulation en vue de remédier les composés néoformés toxiques sont donnés ci-dessous.

Limitation de la néoformation exogène

De nombreuses études se sont intéressées à l'addition d'antioxydants pour limiter la formation d'AAHs ou de HAPs (Meurillon et Engel, 2016). A titre d'exemple, il a été montré que mariner la viande dans de la bière ou du vin (boissons riches en antioxydants) pendant 6h permettait d'inhiber de 88% la formation de PhIP (Melo et al., 2008).

Limitation de la néoformation endogène

La mise au point de formulation adaptée est particulièrement pertinente dans le cas de la formation endogène des composés *N*-nitrosés. En effet comme évoqué précédemment, ces composés néoformés sont majoritairement générés lors de la digestion gastrique avec un rôle central du fer héménique qui agit comme un catalyseur de cette réaction. Il a récemment été montré qu'un régime riche en carbonate de calcium et dans une moindre mesure en vitamine E (α -tocophérol) permettait de bloquer l'effet promoteur du fer héménique sur la formation de composés *N*-nitrosés endogènes (Pierre et al., 2013). L'ajout de carbonate de calcium (150 μ mol/g) dans de la viande cuite nitrifiée a par exemple permis de réduire de moitié le nombre de MDF (Mucin Depleted Foci) qui est l'un des biomarqueurs associé à la cancérogénèse du colon.

Modulation de l'activation métabolique

A titre d'illustration de la modulation de l'activité métabolique par un antioxydant, il a été montré que les crucifères pouvaient inhiber l'activation métabolique des AAHs en empêchant l'activité des cytochromes. Ainsi lors de tests *in vitro*, l'ajout de jus de brocoli (0,3mL de jus/mL) protégeait les cellules étudiées (cellules modifiées dérivées de foie humain) de 90% des effets carcinogènes de IQ tout en protégeant d'autres effets d'AAHs pyrolytiques (Schwab et al., 2000). Cette action protectrice contre les dommages de l'ADN provoqués par les AAHs viendrait d'un produit de dégradation du glucosinolate, le sulforaphane, qui inhiberait l'activité des cytochromes P450.

L'utilisation de la formulation pour limiter l'impact sanitaire de la consommation des composés néoformés présente l'avantage de pouvoir être mise en œuvre tant au niveau industriel par l'élaboration de plats préparés à base de produits carnés qu'au niveau domestique lors de la préparation des repas. Cette option nécessiterait toutefois d'éduquer au préalable le consommateur sur les ingrédients antioxydants à utiliser. Cependant à ce jour les travaux menés sur le sujet sont très empiriques dans le choix des agents remédiants et souvent peu représentatifs des techniques de cuisson réellement employées par les consommateurs. Une approche prometteuse serait de pouvoir prédire si un antioxydant est inhibiteur ou non d'un composé néoformé en se basant sur sa structure. C'est l'objectif du projet MARMEAT qui a été réalisé au sein de l'équipe MASS de l'unité QuaPA. En se basant sur des approches de modélisation moléculaire utilisées en chimie médicinale telles que l'analyse des similarités structurales en 2D (index de Tanimoto) ou 3D (scaffold hoping), la mise au point de modèles de pharmacophores et l'étude de la réactivité via l'analyse des champs électrostatiques, cette étude a permis de mettre en évidence un certain nombre de prérequis dans la structure d'un antioxydant pour qu'il soit inhibiteur de la formation des AAHs, comme par exemple la présence d'un groupement polyphénol avec des groupes hydroxyls en position meta pour augmenter la réactivité de l'antioxydant vis-à-vis de la substitution électrophile aromatique sur l'aldéhyde de Strecker, intermédiaire de la réaction de Maillard aboutissant aux AAHs thermiques. Un tel modèle pourrait également par la suite être généralisé à d'autres familles d'antioxydants et à d'autres types de composés néoformés, ce qui permettrait de conseiller les industriels et les consommateurs sur le choix le plus approprié d'antioxydants pour limiter l'impact des composés néoformés.

3. Stratégie de détection des composés néoformés dans les aliments

Un des verrous majeurs des recherches sur les composés néoformés est la difficulté de leur suivi analytique du fait de leur très faible concentration dans les aliments. Avec les avancées de la chimie analytique, des méthodes dites « omiques » et de la toxicologie prédictive, différentes solutions sont aujourd'hui envisageables.

3.1 Des méthodes de détection directe de plus en plus performantes

Du fait des faibles quantités de composés néoformés dans les aliments, ces substances n'ont finalement été quantifiées que plutôt récemment. A titre d'exemple l'acrylamide a été détecté dans les aliments riches en carbohydrate pour la première fois en 2002 (Tareke et al., 2002). Auparavant les travaux étaient focalisés en priorité sur les composés les plus abondants dans une famille, comme par exemple le PhIP dans les cas des AAHs, du fait des performances limitées des outils mis en œuvre pour leur détection. Cependant avec l'évolution de la sensibilité et de la résolution des techniques de détection (Sanz Alaejos et al., 2008), il est maintenant possible de cibler de nouveaux congénères parfois plus pertinents en terme de risque mais également de travailler sur des profils quasi exhaustifs des congénères néoformés. Dans le cas des AAHs par exemple, l'utilisation d'une HPLC/ESI/MS a non seulement permis d'identifier une nouvelle AAH jusqu'alors inconnue (IQ[4,5-b]) mais également de contrôler la présence de 11 AAHs (dont PhIP, IQ, MeIQx, DiMeIQx) avec une limite de quantification (LOQ) inférieure à 30 pg de AAH/g de viande (Turesky et al., 2005).

3.2 La procédomique : vers la recherche de marqueurs de néoformations

Des travaux ont démontré l'intérêt d'analyser des composés volatils témoins de l'activité métabolique hépatique d'animaux d'élevage pour tracer leur exposition à des micropolluants environnementaux (Berge et al., 2011 ; Ratel et al., 2017 ; Bouhleb et al., 2017). Ces recherches en « volatolomique » visent à identifier des composés volatils marqueurs du métabolisme animal en lien avec une exposition à des molécules chimiques toxiques. En parallèle des études en cours à l'INRA montrent également l'intérêt des analyses de composés volatils pour tracer les conditions de procédés propices à certaines néoformations. Combinée à l'utilisation d'outils chimiométriques dédiés à la recherche de marqueurs (Abou-el-karam et al., 2017 ; Bouhleb et al., 2018) et à des méthodes rapides et peu coûteuses de détection des composés volatils (Brenet et al., 2018), cette approche baptisée « procédomique » pourrait notamment être utilisée dans le cadre des autocontrôles en entreprise.

3.3 L'analyse dirigée par l'effet : vers la recherche non ciblée de contaminants

Littéralement baptisée « analyse dirigée par l'effet » (EDA), cette approche offre de nouvelles solutions pour la recherche systématique de composés néoformés problématiques d'un point de vue toxicologique. Comme schématisé sur la Figure 2, la première étape de l'EDA consiste à réaliser une batterie de biotests pour rechercher une éventuelle toxicité de l'échantillon (par exemple génotoxicité ou perturbation endocrinienne). En cas de détection d'échantillons positifs, les étapes suivantes de l'EDA vont consister à identifier les composés responsables des effets toxicologiques mis en évidence en couplant des techniques de spectrométrie de masse haute résolution permettant d'avoir une analyse fine des constituants de l'échantillon à des approches de bio-informatique qui vont permettre de déterminer parmi ces constituants, ceux qui sont susceptibles d'être à l'origine de la toxicité de l'échantillon. A partir de l'analyse des effets biologiques, on peut ainsi remonter à la molécule responsable de cet effet (Brack, 2003). Une telle méthode a par exemple permis de déterminer quelques composés responsables de la toxicité de certains matériaux d'emballage alimentaire (Bengtström et al., 2016). Il pourrait être également prometteur de mettre en place une telle approche pour l'étude des néoformations au sein des aliments lors des procédés de transformation. On pourrait ainsi analyser biologiquement un aliment avant et après le procédé (mesure de la génotoxicité par exemple). Si l'aliment transformé démontre une toxicité supérieure à celle de l'aliment brut, cela indiquerait qu'il y a eu néoformation de composés toxiques. L'application de la méthode EDA pourrait permettre de remonter aux composés responsables de cette activité toxicologique en utilisant de la spectrométrie de masse haute résolution et différents biotests.

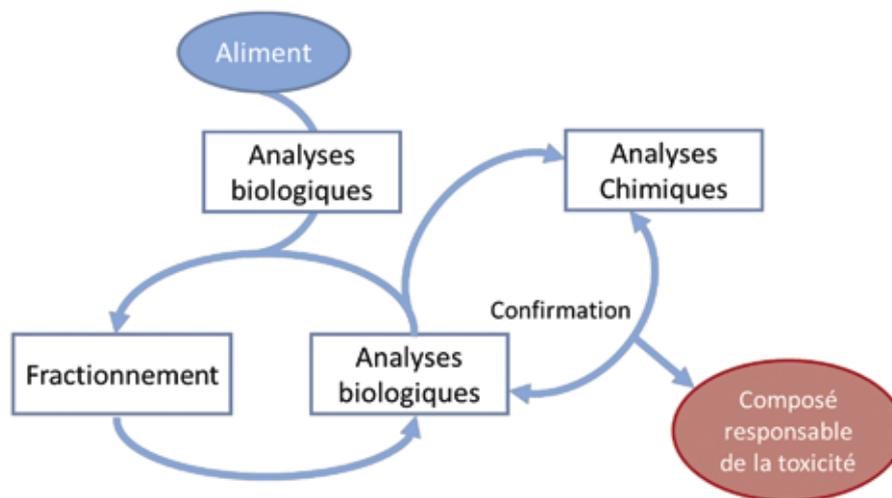


Figure 2 : Schéma illustrant l'EDA dans le cas d'un aliment

PERSPECTIVES

A l'heure où le consommateur est de plus en plus exigeant quant à la qualité des denrées qu'il consomme, il est nécessaire d'assurer la sécurité chimique des aliments notamment en limitant la formation de composés néoformés présentant sur le long terme un risque pour la santé du consommateur. Avec l'allongement de la durée de vie moyenne, il a été observé une recrudescence de certaines pathologies telles que les cancers ou les maladies neurodégénératives qui pourrait être liée à l'exposition chronique à certains contaminants des aliments. De plus, certaines populations spécifiques telles que les nourrissons ou les personnes âgées sont particulièrement vulnérables à ces composés néoformés qui peuvent induire des pathologies chroniques inflammatoires. La mise au point de méthodes de détection permettant le suivi de ces composés néoformés est donc une nécessité.

A l'heure actuelle, l'étude de ces composés se fait par famille et il n'existe que très peu de travaux prenant en compte les effets que pourraient avoir les **mélanges de contaminants néoformés intra ou inter-familles** (AAHs, HAPs, acrylamide...) sur l'organisme. Certains néoformés pourraient, en mélange, avoir des effets synergiques ou antagonistes, et donc avoir une réactivité bien différente des composés seuls. Il a par exemple déjà été montré que le mélange de deux composés, le BaP, un HAP et le PhIP, une AAH (Jamin et al., 2013), démultipliait l'activité génotoxique. Le nombre d'adduits de PhIP avec l'ADN est multiplié par 5 lorsque le milieu contient également du BaP (avec un ratio 10/1 PhIP/BaP). Ce résultat pourrait s'expliquer par une bioactivation métabolique plus importante du PhIP consécutive à une induction de l'activité de certaines enzymes par le BaP.

L'étude de la **réactivité des migrants d'emballage sur les constituants de l'aliment** est également un domaine encore très peu étudié. En effet, la thématique des migrants d'emballage est en plein essor cette dernière décennie et certains travaux ont mis en évidence que ces migrants d'emballage seraient finalement la source majoritaire de contamination des aliments, dépassant les autres sources de contamination (pesticides, polychlorobiphényles, solvants chlorés, benzène...) d'un facteur 100 à 1 000 (Grob et al., 2006). Mais, à ce jour, les travaux sont focalisés sur les molécules migrantes en elles-mêmes, et peu voire pas de travaux considèrent la réactivité de ces molécules avec des composés de l'aliments et s'intéressent aux potentielles molécules toxiques alors générées. Cette voie de néoformation via les composés d'emballage est donc à explorer.*

Références bibliographiques

- Abou-el-karam S., Ratel J., Kondjoyan N., Truan C., Engel E., 2017. Marker discovery in volatolomics based on systematic alignment of GC-MS signals: Application to food authentication. *Anal Chim Acta* 991, 58-67.
- Alaejos M.S., Afonso A.M., 2011. Factors that affect the content of heterocyclic aromatic amines in foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 10(2), 52-108.
- Alomirah H., Al-Zenki S., Al-Hooti S., Zaghoul S., Sawaya W., Ahmed N., Kannan K., 2011. Concentrations and dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from grilled and smoked foods. *Food Control* 22(12), 2028-2035.
- ANSES, 2011. Etude de l'alimentation totale française 2 (EAT 2). Avis de l'ANSES, rapport d'expertise.
- ANSES, 2015. Dangers chimiques liés à la présence de substances néoformées dans les aliments au cours des procédés de fabrication, de transformation et de préparation des aliments. Fiche outils
- Augustsson K., Skog K., Jägerstad M., Steineck G., 1997. Assessment of the human exposure to heterocyclic amines. *Carcinogenesis* 18(10), 1931-1935.
- Bartsch H., Montesano R., 1984. Relevance of nitrosamines to human cancer. *Carcinogenesis* 5(11), 1381-1393.
- Benford D., Bolger P. M., Carthew P., Coulet M., DiNovi M., Leblanc J.-C., Renwick A.G., Setzer W., Schlatter J., Smith B., Slob W., Williams G., Wildemann T., 2010. Application of the Margin of Exposure (MOE) approach to substances in food that are genotoxic and carcinogenic. *Food and Chemical Toxicology* 48, S2-S24.
- Bengtström L., Rosenmai A.K., Trier X., Jensen L.K., Granby K., Vinggaard A.M., Driffield M., Højslev Petersen J., 2016. Non-targeted screening for contaminants in paper and board food-contact materials using effect-directed analysis and accurate mass spectrometry. *Food Additives & Contaminants: Part A* 33(6), 1080-1093.
- Berge P., Ratel J., Fournier A., Jondreville C., Feidt C., Roudaut B., Le Bizec B., Engel E., 2011. Use of Volatile Compound Metabolic Signatures in Poultry Liver to Back-Trace Dietary Exposure to Rapidly Metabolized Xenobiotics. *Environmental Science & Technology* 45(15), 6584-6591.
- Bouhlef J., Jouan-Rimbaud Bouveresse D., Abouelkaram S., Baéza E., Jondreville C., Travel A., Ratel J., Engel E., Rutledge D.N., 2018. Comparison of common components analysis with principal components analysis and independent components analysis: Application to SPME-GC-MS volatolomic signatures. *Talanta* 178, 854-863.
- Bouhlef J., Ratel J., Abouelkaram S., Mercier F., Travel A., Baéza E., Jondreville C., Dervilly-Pinel G., Marchand P., Le Bizec B., Dubreil E., Mompelat S., Verdon E., Inthavong C., Guérin T., Rutledge D. N., Engel E., 2017. Solid-phase microextraction set-up for the analysis of liver volatolome to detect livestock exposure to micropollutants. *Journal of Chromatography A* 1497, 9-18.
- Bouvard V., Loomis D., Guyton K.Z., Grosse Y., Ghissassi F.E., Benbrahim-Tallaa L., et al., 2015. Carcinogenicity of consumption of red and processed meat. *Lancet Oncol.*, Published online, October 26, 2015.
- Brack W., 2003. Effect-directed analysis: a promising tool for the identification of organic toxicants in complex mixtures? *Anal Bioanal Chem* 377, 397-407.
- Brenet S., John-Herpin A., Gallat F.-X., Musnier B., Buhot A., Herrier C., Rousselle T., Livache T., Hou Y., 2018. Highly-Selective Optoelectronic Nose Based on Surface Plasmon Resonance Imaging for Sensing Volatile Organic Compounds. *Analytical Chemistry* 90(16), 9879-9887.
- Cornée J., Lairon D., Velema J., Guyader M., Berthezene P., 1992. An estimate of nitrate, nitrite and N-nitrosodimethylamine concentrations in French food products or food groups. *Sci. Aliments* 12, 155-197.
- Crépeaux G., Bouillaud-Kremarik P., Sikhayeva N., Rychen G., Soulimani R., Schroeder H., 2013. Exclusive prenatal exposure to a 16 PAH mixture does not impact anxiety-related behaviours and regional brain metabolism in adult male rats: a role for the period of exposure in the modulation of PAH neurotoxicity. *Toxicol Lett* 221(1), 40-46.
- European Commission, 2006. COMMISSION REGULATION (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union* L364, 5-24
- European Commission, 2011. COMMISSION REGULATION (EU) No 835/2011 of 19 August 2011 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels for polycyclic aromatic hydrocarbons in foodstuffs. *Official Journal of the European Union* L215, 4-8.
- European Commission, 2017. COMMISSION REGULATION (EU) 2017/2158 of 20 November 2017 establishing mitigation measures and benchmark levels for the reduction of the presence of acrylamide in food. *Official Journal of the European Union* L304, 24-44
- European Food Safety Authority EFSA, 2005. Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA related to a harmonised approach for risk assessment of substances which are both genotoxic and carcinogenic. *EFSA Journal* 282, 1-31.
- European Food Safety Authority EFSA, 2008. Polycyclic aromatic hydrocarbons in food - Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain. *EFSA Journal* 724, 1-114.

- European Food Safety Authority EFSA, 2017. Re-evaluation of sodium nitrate (E 251) and potassium nitrate (E 252) as food additives - EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food. EFSA Journal 15(6), 4787.
- Gangolli S.D., van den Brandt P.A., Feron V.J., Janzowsky C., Koeman J.H., Speijers G.J.A., Spiegelhalter B., Walker R., Wishnok J.S., 1994. Nitrate, nitrite and N-nitroso compounds European Journal of Pharmacology, Environmental Toxicology and Pharmacology Section 292, 1-38.
- Grob K., Biedermann M., Scherbaum E., Roth M., Rieger K., 2006. Food Contamination with Organic Materials in Perspective: Packaging Materials as the Largest and Least Controlled Source? A View Focusing on the European Situation. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 46(7), 529-535.
- Herrmann S.S., Granby K., Duedahl-Olesen L., 2015. Formation and mitigation of N-nitrosamines in nitrite preserved cooked sausages. Food Chemistry 174, 516-526.
- Honikel K.O., 2008. The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. Meat Sci 78(1-2), 68-76.
- IARC, 1977. Some N-nitroso compounds. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans 17.
- IARC, 1993. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans 56.
- IARC, 1998. Some N-nitroso compounds. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans 17.
- IARC, 2010. Benzo[a]pyrene. IARC Monographs 100F, 111-144.
- IARC, 2018. Red meat and processed meat. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans 114.
- Jakszyn P., Bingham S., Pera G., Agudo A., Luben R., Welch A., Boeing H., del Giudice G., Palli D., Saieva C., Krogh V., Sacerdote C., Tumino R., Panico S., Berglund G., Simán H., Hallmans G., Sanchez M.J., Larrañaga N., Barricarte A., Chirlaque M.D., Quirós J.R., Key T.J., Allen N., Lund E., Carneiro F., Linseisen J., Nagel G., Overvad K., Tjønneland A., Olsen A., Bueno-de-Mesquita H.B., Ocké M.O., Peeters P.H.M., Numans M.E., Clavel-Chapelon F., Trichopoulou A., Fenger C., Stenling R., Ferrari P., Jenab M., Norat T., Riboli E., Gonzalez C.A., 2006. Endogenous versus exogenous exposure to N-nitroso compounds and gastric cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-EURGAST) study. Carcinogenesis 27(7), 1497-1501.
- Jamin E.L., Riu A., Douki T., Debrauwer L., Cravedi J.P., Zalko D., Audebert M., 2013. Combined genotoxic effects of a polycyclic aromatic hydrocarbon (B(a)P) and an heterocyclic amine (PhIP) in relation to colorectal carcinogenesis. PLoS One 8(3), e58591.
- Kazerouni N., Sinha R., Hsu C.-H., Greenberg A., Rothman N., 2001. Analysis of 200 food items for benzo[a]pyrene and estimation of its intake in an epidemiologic study. Food and Chemical Toxicology 39, 423-436.
- Knize M.G., Dolbeare F.A., Carroll K.L., Moore D.H., Felton J.S., 1994. Effect of cooking time and temperature on the heterocyclic amine content of fried beef patties. Food and Chemical Toxicology 32(7), 595-603.
- Melo A., Viegas O., Petisca C., Pinho O., Ferreira I., 2008. Effect of beer/red wine marinades on the formation of heterocyclic aromatic amines in pan-fried beef. J. Agric. Food Chem., 56(22), 10625-10632.
- Meurillon M., Engel E., 2016. Mitigation strategies to reduce the impact of heterocyclic aromatic amines in proteinaceous foods. Trends in Food Science & Technology 50, 70-84.
- Murkovic M., 2004. Formation of heterocyclic aromatic amines in model systems. Journal of Chromatography B Analyt Technol Biomed Life Sci 802(1), 3-10.
- Olsson V., Solyakov A., Skog K., Lundstrom K., Jägerstad M., 2002. Natural variations of precursors in pig meat affect the yield of heterocyclic amines - Effects of RN genotype, feeding regime, and sex. J. Agric. Food Chem. 50, 2962-2969.
- Pierre F.H.F., Martin O.C.B., Santarelli R.L., Taché S., Naud N., Guéraud F., Audebert M., Dupuy J., Meunier N., Attaix D., Vendevue J.-L., Mirvish S.S., Kuhnle G.C.G., Cano N., Corpet D.E., 2013. Calcium and α -tocopherol suppress cured-meat promotion of chemically induced colon carcinogenesis in rats and reduce associated biomarkers in human volunteers. Am J Clin Nutr 98(5), 1255-1262.
- Ratel J., Planche C., Mercier F., Blinet P., Kondjoyan N., Marchand P., Fournier A., Travel A., Jondreville C., Engel E., 2017. Liver volatolomics to reveal poultry exposure to γ -hexabromocyclododecane (HBCD). Chemosphere 189, 634-642.
- Rohrmann S., Zoller D., Hermann S., Linseisen J., 2007. Intake of heterocyclic aromatic amines from meat in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Heidelberg cohort. British Journal of Nutrition 98(6), 1112-1115.
- Ruan E.D., Juárez M., Thacker R., Yang X., Dugan M.E.R., Aalhus J.L., 2014. Dietary vitamin E effects on the formation of heterocyclic amines in grilled lean beef. Meat Sci, 96, 849-853.

- Sanz Alaejos M., Ayala J.H., Gonzalez V., Afonso A.M., 2008. Analytical methods applied to the determination of heterocyclic aromatic amines in foods. *Journal of Chromatography B Analyt Technol Biomed Life Sci* 862(1-2), 15-42.
- Schroeder H., 2010. Neurotoxicité et maladies neurodégénératives : risques pour les travailleurs et en population générale en relation avec l'exposition aux substances chimiques - Les hydrocarbures aromatiques polycycliques présentent-ils un risque de neurotoxicité développementale ? *Anses • Bulletin de veille scientifique • Santé / Environnement / Travail*, 83-88.
- Schwab C.E., Huber W.W., Parzefall W., Hietsch G., Kassie F., Schulte-Hermann R., Knasmüller S., 2000. Search for compounds that inhibit the genotoxic and carcinogenic effects of heterocyclic aromatic amines. *Critical Reviews in Toxicology* 30(1), 1-69.
- Simko P., 2005. Factors affecting elimination of polycyclic aromatic hydrocarbons from smoked meat foods and liquid smoke flavorings. *Mol Nutr Food Res* 49, 637-647.
- Skog K., Johansson M., Jägerstad M., 1998. Carcinogenic heterocyclic amines in model systems and cooked foods: a review on formation, occurrence and intake. *Food and Chemical Toxicology* 36, 879-896.
- Skog K., Solyakov A., Arvidsson P., Jägerstad M., 1998. Analysis of nonpolar heterocyclic amines in cooked foods and meat extracts using gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 803, 227-233.
- Skog K., Solyakov A., Jägerstad M., 2000. Effects of heating conditions and additives on the formation of heterocyclic amines with reference to amino-carbolines in a meat juice model system. *Food Chemistry* 68, 299-308.
- Stadler R.H., Lineback D.R., 2009. Process-induced food toxicants, occurrence, formation, mitigation and health risks. New Jersey: John Wiley & Sons.
- Sugimura T., Wakabayashi K., Nakagama H., Nagao M., 2004. Heterocyclic amines: mutagens/carcinogens produced during cooking of meat and fish. *Cancer science* 95(4), 290-299.
- Tareke E., Rydberg P., Karlsson P., Eriksson S., Törnqvist M., 2002. Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *J. Agric. Food Chem.* 50, 4998-5006.
- Tricker A.R., 1997. N-nitroso compounds and man: sources of exposure, endogenous formation and occurrence in body fluids. *European Journal of Cancer Prevention* 6, 226-268.
- Turesky R.J., Taylor J., Schnackenberg L., Freeman J.P., Holland R.D., 2005. Quantitation of carcinogenic heterocyclic aromatic amines and detection of novel heterocyclic aromatic amines in cooked meats and grill scrapings by HPLC/ESI-MS. *J. Agric. Food Chem.* 53, 3248-3258.
- WHO, 2008. N-Nitrosodimethylamine in Drinking-water. In Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality: WHO.
- Zamora R., Alcón E., Hidalgo F.J., 2014. Ammonia and formaldehyde participate in the formation of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in addition to creati(ni)ne and phenylacetaldehyde. *Food Chemistry* 155, 74-80.
- Zimmerli B., Rhyn P., Zoller O., Schlatter J., 2001. Occurrence of heterocyclic aromatic amines in the Swiss diet: analytical method, exposure estimation and risk assessment. *Food Additives and Contaminants* 18(6), 533-551.

IMPACT DES MÉLANGES DE PESTICIDES

Gamet-Payraastre Laurence ¹

¹ ToxAlim, UMR1331, INRA – Université de Toulouse, Toxicologie Intégrative et Métabolisme.
180, Chemin de Tournefeuille, F-31300 Toulouse

Correspondance : laurence.payraastre@inra.fr

RÉSUMÉ

Les pesticides sont considérés comme des facteurs de risque pour la santé chez l'homme. De nombreuses études épidémiologiques montrent en effet une association entre l'exposition professionnelle aux pesticides et l'apparition de certaines pathologies. L'exposition professionnelle des parents et l'exposition résidentielle en période prénatale peuvent impacter la santé des enfants. La population générale est exposée via l'alimentation à des cocktails de pesticides à faibles doses et la question posée est de savoir quels sont les effets d'une telle exposition sur la santé. Des études épidémiologiques récentes montrent que le risque de développer certains cancers et troubles métaboliques est plus faible dans les populations dont la proportion, dans la ration, d'aliments issus de l'agriculture biologique est importante. Les effets des pesticides mis en évidence dans des cellules humaines *in vitro* ou chez l'animal *in vivo* renforcent la plausibilité du lien entre exposition aux pesticides et santé. Les pesticides sont des composés biologiquement actifs et exercent des effets sur diverses cibles cellulaires et moléculaires. Les mélanges de pesticides conduisent à des effets variés et la base des interactions entre composés est complexe et implique un réseau de cibles et de mécanismes à différents niveaux. De plus, pour améliorer nos connaissances sur l'impact des pesticides chez le consommateur il est important de prendre en considération la chronicité de l'exposition.

ABSTRACT

Pesticides are considered as risk factors for human health. Many epidemiological studies show a positive association between occupational exposure to pesticides and the development of some pathologies. Parental occupational exposure as well as residential exposure during prenatal can affect children's health. Consumers are exposed through food intake to low-dose pesticide cocktails and the question of the effects of such an exposure on health arises. Recent epidemiological studies show that the risk of certain cancers and metabolic disorders is lower in population whose proportion of organic food in diet is important. Pesticides are biologically active compounds and have various effects on many cellular and molecular targets. Their effects observed *in vitro* in human cell models or *in vivo* in animals strengthen the plausibility of the link between pesticide exposure and human health. Pesticide mixtures lead to a variety of effects and the interaction between pesticides is complex and involves a network of targets and mechanisms at different levels. Moreover, it is important to consider the chronicity of exposure to improve our knowledge of the impact of low dose pesticide mixtures on consumers.

1. Les pesticides : des facteurs de risque pour la santé

Les pesticides sont considérés comme des facteurs de risque pour la santé chez l'homme. De nombreuses études épidémiologiques montrent en effet une association entre l'exposition professionnelle aux pesticides et l'apparition de pathologies graves telles que certains cancers, maladies neurodégénératives et métaboliques. Les résultats de l'expertise INSERM publiée en 2013 montrent notamment un excès de risque de développer un cancer de la prostate, un lymphome, myélome ou une leucémie chez les agriculteurs (INSERM, 2013). Une augmentation du risque de développement des tumeurs cérébrales chez les utilisateurs professionnels de pesticides a été récemment confortée par les résultats issus de la cohorte française d'agriculteurs AGRICAN (Piel et al., 2017). De nombreuses données épidémiologiques montrent par ailleurs que les populations professionnellement exposées aux pesticides présentent un excès de risque supérieur à 50% de développer la maladie de Parkinson (INSERM, 2013; Mark et al., 2012; Mostafalou et Abdollahi, 2017). Des liens entre l'exposition professionnelle aux pesticides et des atteintes de la fertilité masculine ou des impacts sur les taux d'hormones thyroïdiennes ont aussi été reportés dans la littérature (5). Aujourd'hui de nombreuses études montrent une association entre l'utilisation professionnelle de pesticides et le risque de diabète de type 2 (Montgomery et al., 2008; Jaacks et Staimez, 2015; Velmurugan et al., 2008). L'exposition professionnelle aux pesticides n'affecterait pas uniquement l'utilisateur mais pourrait aussi avoir un impact sur sa descendance. Il existe notamment une présomption forte d'un lien entre l'exposition parentale et l'apparition de leucémies, de tumeurs cérébrales, de malformations congénitales et de mort fœtale dans la descendance (INSERM, 2013).

L'exposition résidentielle aux pesticides peut aussi jouer un rôle dans l'augmentation de l'incidence de certaines pathologies chez les enfants comme les tumeurs du cerveau, les leucémies, les troubles neuro-développementaux (Van Maele-Fabry et al., 2017, 2019; Llop et al., 2013). Une baisse du poids des enfants à la naissance et un surpoids des enfants à l'âge de 7 ans ont aussi été corrélés avec l'exposition environnementale aux pesticides (Birks et al., 2016; Agay-Shay et al., 2015).

Les consommateurs sont exposés aux pesticides principalement via l'alimentation. Différents rapports de l'agence européenne de sécurité sanitaire des aliments (EFSA) montrent en effet la présence pesticides dans de nombreuses denrées alimentaires (fruits et légumes) (EFSA, 2017). Les risques observés après utilisation professionnelle ou résidentielle des pesticides ne sont pas applicables aux consommateurs car les voies et les doses d'exposition sont différentes. Par contre, aujourd'hui des études de population permettent d'apporter des éléments de réponse quant à l'impact d'une exposition alimentaire aux pesticides. Dans l'étude de cohorte NutriNet-Santé réalisée sur une population d'adultes français, les sujets possédant une alimentation enrichie en produits issus de l'agriculture biologique présentent un risque moindre de développer un cancer et une diminution du risque de surpoids et de développer un syndrome métabolique par rapport aux non consommateurs ou consommateurs épisodiques (Baudry et al., 2018 (a et b)). L'existence ou la présomption d'un lien entre pesticides et santé telles qu'elles sont rapportées dans les études épidémiologiques ne permettent pas de prouver le lien de causalité. Les arguments de causalité peuvent être apportés par les études expérimentales qui évaluent l'impact de ces composés sur les cibles cellulaires humaines ou animales et recherchent si les mécanismes d'action des pesticides sont comparables à ceux qui sous-tendent certaines pathologies.

2. Les arguments de causalité

Les pesticides sont des composés biologiquement actifs agissant sur des fonctions essentielles des organismes cibles (tels que les insectes, les mauvaises herbes, les champignons etc.). Ils affectent par exemple, le système respiratoire, le système nerveux ou la mue chez les insectes, la photosynthèse chez les végétaux, la division cellulaire, la biosynthèse d'acides aminés chez les plantes et microorganismes. Les études expérimentales réalisées *in vitro* dans les cellules humaines ou animales ou *in vivo* chez l'animal montrent que ces composés peuvent impacter de nombreuses cibles cellulaires (Rizzati et al., 2016 ; Mostafalou et Abdollahi, 2013 ; Gamet-Payrastré et Lukowicz, 2017). Ils peuvent interagir avec des récepteurs nucléaires impliqués dans les régulations métaboliques, endocrines et les mécanismes de détoxification ; ils peuvent agir directement sur l'ADN, induire des cassures, mutations et fusion de gènes et peuvent affecter l'activité des mitochondries, organites jouant un rôle primordial dans la respiration cellulaire et la production d'énergie indispensable au bon déroulement des fonctions de la cellule et, par extension, de l'organisme (Gamet-Payrastré et Lukowicz, 2017 ; INSERM, 2013). L'impact de certains pesticides sur l'enzyme mitochondriale succinate déshydrogénase pourrait notamment conduire à des modifications épigénétiques (Favier et Letouzé, 2013). L'induction d'un stress oxydant par certains pesticides, un phénomène pouvant altérer l'ADN, protéines et lipides cellulaires est aussi un mécanisme par lequel ces composés peuvent exercer leur toxicité (Wang et al., 2016).

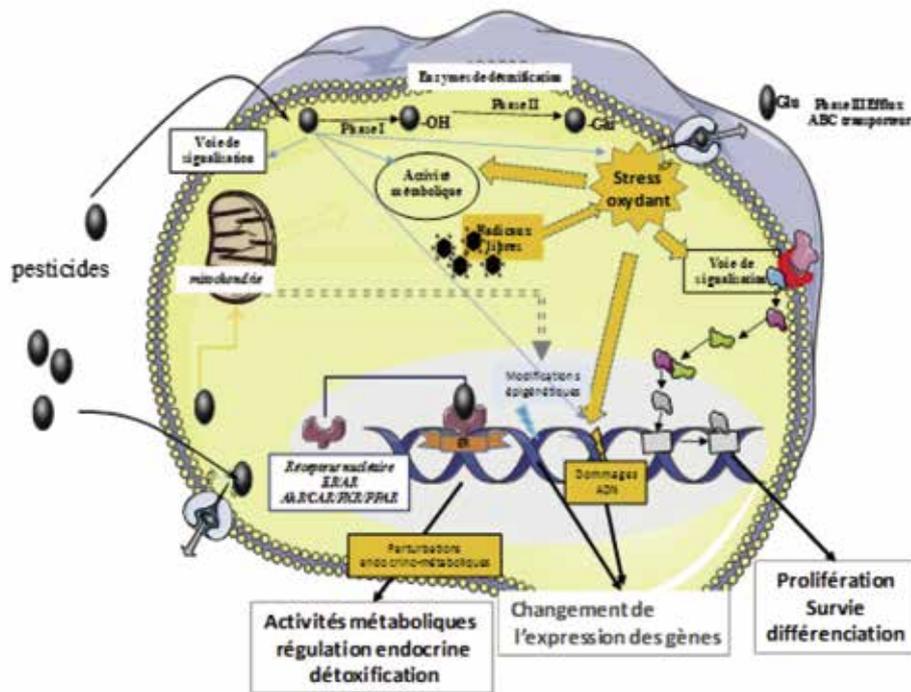


Figure 1 : Impact des pesticides sur différentes cibles cellulaires

Les pesticides peuvent aussi interférer avec les voies de signalisation cellulaire qui permettent le transfert de différents signaux depuis la membrane cellulaire jusqu'aux gènes et sont impliquées dans le contrôle de différentes fonctions (prolifération, survie, métabolisme etc) (INSERM, 2013). A l'échelle de l'organisme, les pesticides peuvent induire dans les cellules neuronales un stress oxydant

et une mort cellulaire, phénomènes observés lors des processus de dégénérescence neuronale (INSERM 2013). Certains composés perturbent la production d'insuline par le pancréas, affecte les fonctions métaboliques, du foie et du tissu adipeux, autant d'effets qui peuvent expliquer leur rôle dans l'étiologie des pathologies métaboliques (Wang et al., 2016 ; Evangelou et al., 2016 ; Maqbool et al., 2015). De nombreuses études montrent que les pesticides peuvent impacter le microbiote (Claus et Ellero-Simatos, 2016), un écosystème dynamique jouant un rôle prépondérant dans de nombreuses fonctions physiologiques de l'hôte. Des déséquilibres de cet écosystème intestinal ont été associés à de nombreuses pathologies (maladies métaboliques et/ou inflammatoire ou comportementale). Ainsi certaines études suggèrent que les pesticides pourraient indirectement être à l'origine de troubles métaboliques et fonctionnels en affectant le microbiote intestinal (Kakumanu et al., 2016 ; Mao et al., 2018 ; Jin Y., et al., 2015). Par ailleurs une étude récente montre que certains pesticides organophosphorés peuvent être métabolisés par le microbiote intestinal en composés capables de stimuler la néoglucogénèse et ainsi perturber l'homéostasie métabolique (Velmurugan et al., 2017).

Compte tenu des effets pléiotropiques de ces composés la question de l'impact des mélanges de pesticides suscite un intérêt croissant.

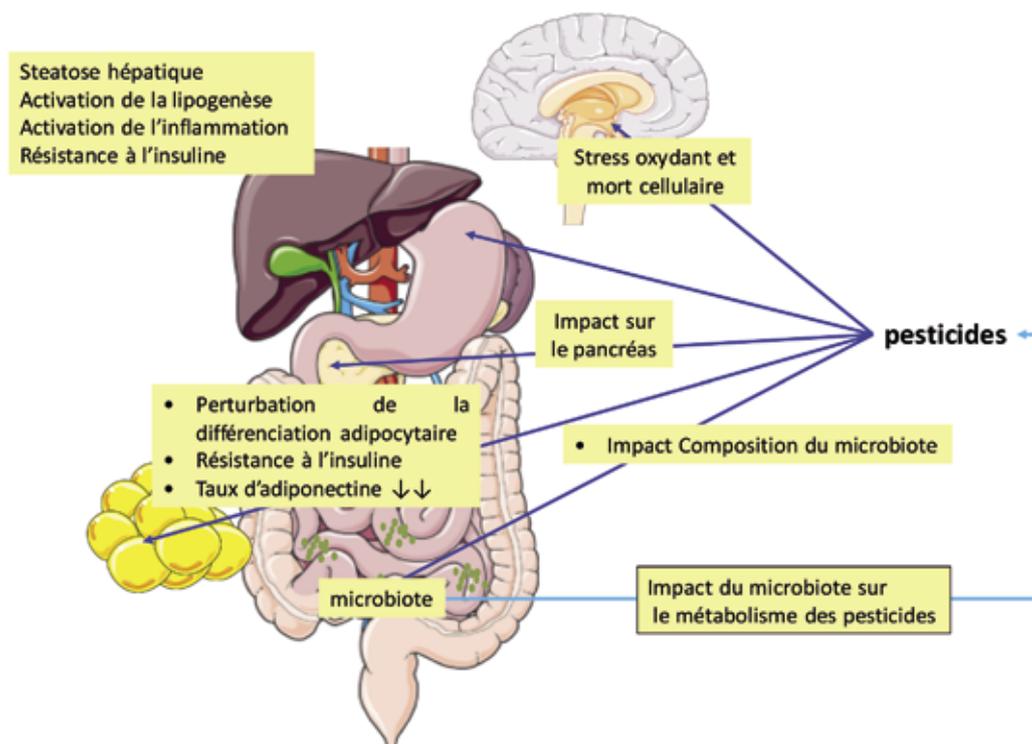


Figure 2 : Exemple de cibles des pesticides au niveau de l'organisme

3. Impact des mélanges de pesticides

Les différents effets dus à une combinaison de composés quels qu'ils soient peuvent être liés soit à une addition de doses, ou à un phénomène d'interaction i.e. (i) synergie (un des composés du mélange accroît l'effet de l'autre), (ii) potentialisation (augmentation de l'effet d'un produit par une

substance n'ayant pas d'effet) (iii) antagonisme (dans ce cas l'effet du mélange est plus faible que l'effet de l'un des produits seul).

Dans une revue récente de la littérature (Rizzati et al., 2016) nous avons étudié 78 études expérimentales liées à l'impact de mélange de pesticides dans des modèles animaux ou humains. Ces études montrent que l'effet cocktail peut se traduire par un large spectre de réponses. De l'ensemble des études répertoriées dans cette revue, 48% des effets cocktails étaient dus à une addition de doses et 35% à des interactions qui en majorité (71%) étaient liées à une synergie. Ces interactions sont assez complexes puisqu'elles impliquent un réseau de cibles et de mécanismes à différents niveaux (cellulaire et de l'organisme). Les interactions entre pesticides peuvent se produire au niveau toxicocinétique. Tout composé exogène est pris en charge au niveau cellulaire par les enzymes du métabolisme des xénobiotiques (EMX). Deux étapes principales caractérisent ce processus : l'activation métabolique par les enzymes de la phase I (cytochrome), et celle de la phase II (glutathion-S-transférase, sulfotransférase par ex). Les enzymes de la phase I (principalement les cytochromes P450), catalysent surtout les réactions d'oxydo-réduction et d'hydrolyse. Les enzymes de la phase II (glutathion-S-transférases [GST], UDP glucuronosyl transférases [UGT]), dites de conjugaison, catalysent les réactions de conjugaison. Généralement, les transporteurs (P-glycoprotéine [Pgp], multidrug resistance proteins [MRP]) excluent au travers des membranes les xénobiotiques, et leurs dérivés, en vue de leur élimination de la cellule. Un composé peut altérer ces activités métaboliques et modifier la biodisponibilité et donc la toxicité des autres composés du mélange (Svendsen et al., 2010). Deux composés appartenant à des familles chimiques différentes peuvent interagir en synergie par différents mécanismes conduisant au même effet (Corbel et al., 2006). L'interaction des pesticides dans un mélange pourrait aussi se produire au niveau de leurs cibles cellulaires et moléculaires. Des études récentes montrent que deux composés peuvent interagir au sein même de la poche du ligand d'un récepteur nucléaire (Delfosse et al., 2015).

Les effets cocktails peuvent provenir d'un réseau d'interactions impliquant différentes cibles cellulaires. Les effets combinés du paraquat et du maneb sont consécutifs à des impacts sur la prolifération, les systèmes de transport, l'équilibre redox, les voies du métabolisme intermédiaire (Roede et al., 2014). Les interactions entre deux composés peuvent être synergiques ou antagonistes en fonction de la dose de chaque composé dans le mélange. Les réponses « non additives » ne sont pas limitées aux fortes doses (Christen et al., 2014).

4. Exemple de l'impact d'une exposition alimentaire à un cocktail de pesticides à faibles doses chez la souris

Dans notre étude récemment publiée (Lukowicz et al., 2018) des souris ont été exposées pendant un an à un cocktail de 6 pesticides (captan, boscalide, chlorpyrifos, thiaclopride, thiophanate et ziram). Ces pesticides ont été choisis parce qu'ils sont à la fois utilisés dans les pommeraies et retrouvés sur les pommes selon les enquêtes de l'EFSA. Pour mimer l'exposition du consommateur les pesticides ont été incorporés dans l'aliment des souris. Chaque souris a reçu l'équivalent de la dose journalière tolérable de chaque pesticide. Cette dose exprimée en mg/kg de poids corporel est définie par les agences de sécurité sanitaire comme la dose qui peut être consommée tout au long de la vie via l'alimentation ou l'eau potable sans exercer d'effet nocif sur la santé. Différents marqueurs métaboliques (poids corporel, tolérance au glucose, analyse du sang et des urines, métabolisme du foie) ont été suivis tout au long de cette exposition pour évaluer les conséquences de l'exposition à ce cocktail de pesticides à faible dose sur l'homéostasie métabolique. Après 6 mois d'exposition les

males présentent un surpoids par rapport aux individus non exposés. A la fin de l'expérimentation le gain de poids est le double de celui des animaux contrôles et est associé à une augmentation de la masse de tissu adipeux. Cette modification phénotypique est précédée par une dérégulation du métabolisme glucidique. Une intolérance au glucose significative dès 4 mois d'exposition est associée à une hyperglycémie à jeun à la fin de l'expérimentation. Les perturbations observées chez les mâles exposés sont associées à une stéatose hépatique (infiltration de lipide dans le foie). Chez les femelles aucune modification de poids corporel n'est observée après un an d'exposition ; seule une légère perturbation de l'homéostasie métabolique est relevée. Les femelles montrent des perturbations hépatiques (stress oxydant) et une modification de l'activité du microbiote intestinal. Ainsi le mélange de pesticides, dans lequel individuellement ces composés sont présents à une dose non toxique (DJT), induit des troubles métaboliques significatifs chez tous les animaux mais différents selon leur sexe (dimorphisme sexuel). Les différences de réponse entre mâles et femelles seraient liées à des capacités de détoxification des pesticides spécifiques de chaque sexe, qui entraîneraient l'activation de mécanismes moléculaires distincts au niveau hépatique ainsi qu'à un rôle du microbiote.

Exposition alimentaire de souris à un mélange de 6 pesticides à des doses non toxiques (DJA) pendant 1 an.

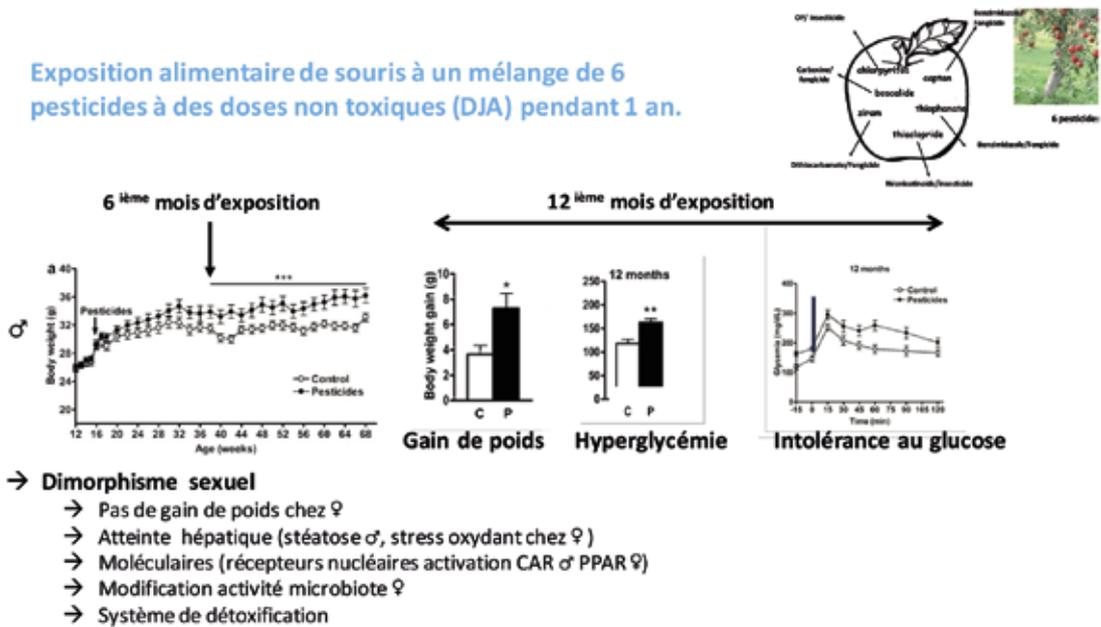


Figure 3 : Impact d'une exposition alimentaire à un cocktail de pesticides (Lukowicz et al., 2018)

Cette étude conforte les résultats obtenus dans les études épidémiologiques suggérant un lien entre l'exposition aux pesticides et l'incidence des maladies métaboliques telles que le diabète de type 2 ou la stéatose hépatique. Cette étude souligne le rôle de la chronicité de l'exposition dans les effets de mélange de pesticides à dose non toxique.

CONCLUSION

Les pesticides sont des composés biologiquement actifs et exercent des effets variés sur diverses cibles cellulaires et moléculaires. Leurs effets mis en évidence dans des cellules humaines *in vitro* ou *in vivo* chez l'animal renforcent la plausibilité du lien entre exposition aux pesticides et santé. Les mélanges de pesticides conduisent à des effets multiples et la base des interactions entre composés est complexe. Les interactions impliquent un réseau de cibles et de mécanismes à différents

niveaux. Pour répondre aux questions de l'impact des pesticides sur la santé chez le consommateur il est important de prendre en considération tous les niveaux d'interaction ainsi que la chronicité de l'exposition.

Remerciements : Les membres de l'équipe Toxicologie Intégrative et Métabolisme (UMR ToxAlim à l'INRA Toulouse) dirigée par Hervé Guillou (Arnaud Polizzi, Fred Lasserre, Séverine Sudre, Marion Régnier, Céline Lukowicz, Sarra Smati, Sharon Baretto, Tiffanie Fougeray, Lorraine Smith, Anne Fougerat, Laila Lakhali, Nicolas Loiseau, Sandrine Ellero-Simatos) ainsi que les plateformes de l'unité Toxalim (Ezop, TRIX, Axiom) et les plateformes INSERM d'histopathologie et de lipidomique.

Références bibliographiques

- Agay-Shay K., Martinez D., Valvi D., Garcia-Esteban R., Basagaña X., Robinson O., et al. 2015. Research | Children's Health Exposure to Endocrine-Disrupting Chemicals during Pregnancy and Weight at 7 Years of Age : A Multi-pollutant Approach. *Env Heal Perspect* [Internet]. 123:1030–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.1409049>
- Baudry J., Assmann K.E., Touvier M., Allès B., Seconda L., Latino-Martel P., Ezzedine K., Galan P., Hercberg S., Lairon D., Kesse-Guyot E., 2018(a). Association of Frequency of Organic Food Consumption With Cancer Risk: Findings From the NutriNet-Santé Prospective Cohort Study. *JAMA Intern Med*. doi:10.1001/jamainternmed.2018.4357. PMID:30422212
- Baudry J., Lelong H., Adriouch S., Julia C., Allès B., Hercberg S., et al., 2018 (b). Association between organic food consumption and metabolic syndrome : cross - sectional results from the NutriNet - Santé study. *Eur J Nutr*. 2018;57(7):2477–88.
- Birks L., Casas M., Garcia M., Alexander J., Barros H., Bergstrom A., et al., 2016. Occupational Exposure to Endocrine-Disrupting Chemicals and Birth Weight and Length of Gestation : A European Meta-Analysis. *Env Heal Perspect*,124(11):1785–93.
- Campos É., Freire C., 2016. International Journal of Hygiene and Exposure to non-persistent pesticides and thyroid function : A systematic review of epidemiological evidence. *Int J Hyg Environ Health* [Internet] 219(6):481–97. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheh.2016.05.006>
- Claus S.P., Ellero-Simatos S., Guillou H., 2016. The gut microbiota: a major player in the toxicity of environmental pollutants? *NPJ Biofilms Microbiomes* 2017 (3): 17001. doi: 10.1038/npjbiofilms.2017.1
- Corbel V., Stankiewicz M., Bonnet J., Grolleau F., Hougard J.M., Lapiéd B., 2006. Synergism between insecticides permethrin and propoxur occurs through activation of presynaptic muscarinic negative feedback of acetylcholine release in the insect central nervous system. *Neurotoxicology* [Internet], 27(4):508–19. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16516970>
- Christen V., Crettaz P., Fent K., 2014. Additive and synergistic antiandrogenic activities of mixtures of azol fungicides and vinclozolin. *Toxicol Appl Pharmacol*, 279(3):455–66.
- Delfosse V., Dendele B., Huet T., Grimaldi M., Boulahtouf A., Gerbal-Chaloin S., et al., 2015. Synergistic activation of human pregnane X receptor by binary cocktails of pharmaceutical and environmental compounds. *Nat Commun* [Internet], 6:8089. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26333997>
- EFSA (European Food Safety Authority), 2017. The 2015 European Union report on pesticide residues in food. Available from: doi:10.2903/j.efsa.2017.4791
- Evangelou E., Ntritsos G., Chondrogiorgi M., Kavvoura F.K., Hernández A.F., Ntzani E.E., et al., 2016 Exposure to pesticides and diabetes : A systematic review and meta-analysis. *Environ Int* [Internet], 91:60–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2016.02.013>
- Favier J., Letouzé E., 2013. Mutations de la succinate déshydrogénase et méthylation de l'ADN. Un nouveau lien entre métabolisme cellulaire, épigénétique et cancer. *Med Sci (Paris)*, Vol. 29(12), 1092 - 1094. DOI <https://doi.org/10.1051/medsci/20132912010>
- Gamet-Payrastré L., Lukowicz C., 2017. Les effets des mélanges de pesticides Impact of pesticides mixtures. *Prat Psychol* [Internet], 52(5):234–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cnd.2017.03.002>
- INSERM, 2013. Pesticides : effets sur la santé. Expert Collect <http://ipubli-inserm.inist.fr/handle/10608/1>.
- Jaacks L.M., Stamez L.R., 2015. Association of persistent organic pollutants and non-persistent pesticides with diabetes and diabetes-related health outcomes in Asia : A systematic review. *Environ Int* [Internet], 76:57–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2014.12.001>

- Jin Y., Zeng Z., Wu Y., Zhang S., Fu Z., 2015. Oral Exposure of Mice to Carbendazim Induces Hepatic Lipid Metabolism Disorder and Gut Microbiota Dysbiosis. *Toxicol Sci.* 147(1):116-26. doi: 10.1093/toxsci/kfv115. Epub 2015 Jun 11.
- Kakumanu M.L., Reeves A.M., Anderson T.D., Rodrigues R.R., Williams M.A., Williams M.A., 2016. Honey Bee Gut Microbiome Is Altered by In-Hive Pesticide Exposures. *Front Microbiol*, 7,1–11.
- Llop S., Julvez J., Fernandez-Somoano A., Santa Marina L., Vizcaino E., Iniguez C., et al., 2013. Prenatal and postnatal insecticide use and infant neuropsychological development in a multicenter birth cohort study. *Env Int [Internet]*, 59:175–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23831543>
- Lukowicz C., Ellero-simatos S., Régnier M., Polizzi A., Lasserre F., Montagner A., et al., 2018. Metabolic Effects of a Chronic Dietary Exposure to a Low-Dose Pesticide Cocktail in Mice : Sexual Dimorphism and Role of the Constitutive Androstane Receptor. *Environ Health Perspect*, 126(June):1–18. Available from: <https://doi.org/10.1289/EHP2877>.
- Mao Q., Manservigi F., Panzacchi S., Mandrioli D., Menghetti I., Vornoli A., et al., 2018. The Ramazzini Institute 13-week pilot study on glyphosate and Roundup administered at human-equivalent dose to Sprague Dawley rats : effects on the microbiome. *Environ Health*, 17(1):50. doi: 10.1186/s12940-018-0394-x
- Maqbool F., Mostafalou S., Bahadar H., Abdollahi M., 2015. Review of endocrine disorders associated with environmental toxicants and possible involved mechanisms. *Life Sci [Internet]*. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2015.10.022>
- Mostafalou S., Abdollahi M., 2017. Pesticides: an update of human exposure and toxicity. *Arch Toxicol [Internet]*, 91(2):549–99. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27722929>
- Montgomery, MP; Kamel F, Saldana TM, Alavanja MC SD. Incident diabetes and pesticide exposure among licensed pesticide applicators: Agricultural Health Study, 1993-2003. *Am J Epidemiol*. 2008;167(10):1235–46.
- Mostafalou S., Abdollahi M., 2013. Pesticides and human chronic diseases : Evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicol Appl Pharmacol [Internet]*, 268(2):157–77. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2013.01.025>
- Piel C., Pouchieu C., Carles C., Boulanger M., Gruber A., Rondeau V., et al., 2017. Central nervous system tumors and agricultural exposures in the prospective cohort AGRICAN. *Int j cancer*, 141(2017):1771–82.
- Rizzati V., Briand O., Guillou H., Gamet-Payrastré L., 2016. Effects of pesticide mixtures in human and animal models: An update of the recent literature. *Chem Biol Interact [Internet]*, 254:231–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27312199>
- Roede J.R., Youngja P., Tran V., Jones D.P., Uppal K., 2014. transcriptome-metabolome wide association study (TMWAS) of maneb and paraquat neurotoxicity reveals network level interconnections in toxicologic mechanism. *Toxicol Reports*, 1:435–44.
- Svendsen C., Siang P., Lister L.J., Rice A., Spurgeon D.J., 2010. Similarity, independence, or interaction for binary mixture effects of nerve toxicants for the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Env Toxicol Chem [Internet]*, 29(5):1182–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20821556>
- van der Mark M., Brouwer M., Kromhout H., Nijssen P., Huss A., 2012. Review Is Pesticide Use Related to Parkinson Disease ? Some Clues to Heterogeneity in Study Results. *Environ Health Perspect*, 120(3):340-7. doi: 10.1289/ehp.1103881.
- Van Maele-Fabry G., Gamet-payrastré L., Lison D., 2017. Residential exposure to pesticides as risk factor for childhood and young adult brain tumors : A systematic review and meta-analysis. *Environ Int [Internet]*, 106:69–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2017.05.018>
- Van Maele-Fabry G., Gamet-payrastré L., Lison D., 2019. Household exposure to pesticides and risk of leukemia in children and adolescents: Updated systematic review and meta-analysis. *Int J Hyg Environ Health*, 222(1):49–67.
- Velmurugan G., Ramprasath T., Swaminathan K., Mithieux G., Rajendhran J., Dhivakar M., et al., 2017. Gut microbial degradation of organophosphate insecticides-induces glucose intolerance via gluconeogenesis. *Genome Biol [Internet]*, 18(1):8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28115022>
- Wang X., Martínez M., Dai M., Chen D., Ares I., Romero A., et al., 2016. Permethrin-induced oxidative stress and toxicity and metabolism . A review. *Environ Res [Internet]*, 149:86–104. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2016.05.003>

PROJET EUROMIX. VERS UNE DÉMARCHE NORMALISÉE, À L'ÉCHELLE EUROPÉENNE, POUR ÉVALUER LES RISQUES DES MÉLANGES DE CONTAMINANTS CHIMIQUES

de Sousa G. ¹, Zucchini-Pascal N., Hichard G., Tutoy M., Rouimi P., Rahmani R.

¹ Inra UMR 1331, Toxalim, Toulouse, Sophia Antipolis.

Correspondance : georges.de-sousa@inra.fr

RÉSUMÉ

Par notre environnement, nous sommes continuellement exposés à des mélanges de produits chimiques. Répondre à la question de cet impact sur notre santé et celle de l'environnement reste un challenge, l'évaluation des risques des produits chimiques à des fins réglementaires reposant principalement sur l'évaluation des composés pris individuellement. Si des méthodologies et les démarches pour évaluer les risques liés à l'exposition combinée à de multiples produits chimiques ont été élaborées pour différents secteurs réglementaires, il n'existe pas d'approche harmonisée et cohérente pour l'évaluation et la gestion de ces risques.

Le programme EuroMix ¹ développe une stratégie de tests, bio-essais et modèles pour évaluer les risques des mélanges chimiques en mettant l'accent sur :

- La réduction des incertitudes par la production de données sur les dangers par des essais *in vitro*,
- L'établissement des priorités en fonction du danger (outils *in-silico*) et/ou sur des considérations relatives à l'exposition,
- L'étude de l'extrapolation des essais *in vitro* comme solutions de rechange fiables pour les essais sur les animaux,
- Le développement de modèles PB-TK d'extrapolation *in vitro/in vivo* dans l'évaluation des risques liés aux mélanges,
- L'élaboration de modèles de danger et d'exposition pour l'évaluation des risques et appliquer ces modèles sur les données nouvellement générées.

Mots-clés : Mélanges, Modèles, Stéatose, Mode d'action, Additivité, Evaluation du risque

ABSTRACT

Through our environment, we are continuously exposed to chemical mixtures. Answering the question of this impact on our health and that of the environment remains a challenge. The risk assessment of chemicals for regulatory purposes is mainly based on the assessment of individual products. While methodologies and guidance for assessing risks related to combined exposure to multiple chemicals have been developed for different regulatory sectors, there is no harmonised and consistent approach to assessing and managing these risks.

The EuroMix program develops a strategy of testing, bioassays and models to assess the risks of chemical mixtures with a focus on:

¹ <https://www.euromixproject.eu/>

- Reduction of uncertainties through the generation of hazard data through in vitro testing,
- Prioritisation according to hazard (in-silico tools) and/or exposure considerations,
- Study of the extrapolation of in vitro tests as reliable alternatives for animal testing,
- Development of PB-TK models for in vitro/in vivo extrapolation in the risk assessment of mixtures,
- Development of hazard and exposure models for risk assessment and application of these models to newly generated data.

Keywords: Mixtures, Models, Stetatosis, Mode of action, Additivity, Risk assessment

1. Toxicité des mélanges : un enjeu sociétal

De nombreuses études épidémiologiques suggèrent une association entre l'exposition chronique à la multitude de molécules organiques (polychlorobiphényles et dioxines, pesticides, plastifiants de type bisphénol-A, retardateurs de flamme polybromés et composés perfluoroalkyls...) et inorganiques (en particulier les métaux lourds de type cadmium...) présent dans notre environnement et l'incidence accrue de certaines pathologies (syndrome métabolique, cancers, maladies neurodégénératives...). Ces études, relayées par les médias, sont un sujet de préoccupation pour la population.

La réalité est que nous sommes exposés à cet ensemble de molécules, de façons intentionnelle et non intentionnelle (alimentation, air, eau, produit de consommation courante, matériaux, médicament, travail...). Ajoutons à cela que l'évaluation réglementaire des risques sanitaires potentiels de ces produits chimiques n'est basée que sur l'évaluation toxicologique des substances i) prises individuellement, ii) administrées à fortes doses et iii) sur des périodes d'exposition courtes (en comparaison d'une vie humaine). Les indices de risque sanitaire (tels qu'ils sont actuellement évalués) ne tiennent pas compte, ou rarement, de la « vraie vie » (Kienzler et al., 2016). Les individus au sein de la population pourront ne pas être exposés aux mêmes mélanges et au même moment, introduisant ainsi un niveau de complexité supplémentaire. Selon leurs concentrations, les voies d'exposition, leurs voies d'accumulation et de biotransformation, leurs cibles cellulaires et moléculaires... respectives, ces xénobiotiques en mélange interagissent entre eux pouvant conduire à des impacts sanitaires non attendus.

Pour évaluer ces effets, les agences d'évaluation font face à des lacunes dans les données, à des incertitudes et à l'absence de modèles empêchant une évaluation réaliste des risques liés à cette exposition (« exposition combinée ») par de multiples voies d'exposition (« exposition agrégée »). En effet, la toxicité d'un mélange de produits ne peut être toujours prédite à partir de celle de ces composants uniques. Des effets additifs (somme des effets des molécules elles-mêmes), antagonistes (réduction des effets par un ou plusieurs produits), potentialisateurs (augmentation des effets d'un produit par un ou plusieurs autres) ou synergiques (un ou plusieurs produits accroît très fortement l'effet d'autres) peuvent survenir (EU 2011). Il existe donc une problématique importante comment évaluer le risque pour les mélanges lorsque ces produits ont des modes d'action différents (Mixture Risk Assessment : MRA) en se basant sur les 4 étapes classiques de cette estimation : 1/ identification des dangers, 2/ caractérisation du danger (dose /réponse) 3/ évaluation de l'exposition, 4/ caractérisation du risque. Sachant que les mélanges sont rarement constitués de composés ayant strictement un MOA similaire

ou dissimilaire, comment estimer les 3 types d'interactions possibles : i/ dose ou concentration addition, ii/ indépendance d'action, iii/ interaction entre les composés (Kortenkamp et al., 2009).

C'est un enjeu sociétal reconnu au niveau du programme H2020, qui finance plusieurs contrats de recherche contribuant à l'évaluation des risques liés aux mélanges (EDC-MixRisk, EuroMix, HBM4EU, SOLUTIONS, EUTOXRISK) (Bopp et al., 2018).

1.1 Apport de l'Inra à la problématique

Depuis l'année 2009, l'Inra, et plus particulièrement les équipes de l'unité TOXALIM, contribuent de façon significative à la problématique des effets toxicologiques pouvant être engendrés par notre exposition à des mélanges de contaminants. En tant que partenaire ou coordinateur de plusieurs projets ANR: EXPOMATPEST (Demur et al. 2013), PERICLES (de Sousa et al. 2014), CIME, NEURODEVETOX, SOMEAT (Dervilly-Pinel et al., 2017), ou financés par d'autres organismes comme HYDROMEL (INCA), MEPIMEX (ONEMA, (Kadar et al., 2017) et MYCOTOX (ANSES, (Kopp et al., 2018)), l'Inra a contribué à développer des approches permettant d'évaluer les effets de mélanges de contaminants variés. Ces études s'attachent à apporter des connaissances pour faire évoluer l'évaluation du risque lorsque les contaminants sont pris dans leur ensemble. Le projet EUROMIX s'inscrit parfaitement dans la continuité de l'ensemble de ces travaux qui ont été menés à l'Inra.

2. Description du projet Euromix, état d'avancement

Via l'environnement, l'alimentation et les produits de consommation courante, la population humaine est exposée de façon chronique (intentionnellement ou non-intentionnellement, à des résidus de pesticides et divers contaminants (Figure 1). Le nombre considérable de ces xénobiotiques ajoutés à leurs effets combinatoires, rend l'évaluation toxicologique réglementaire de ces mélanges difficiles à l'aide des méthodes traditionnelles qui se focalisent sur le profil toxicologique d'un seul constituant.

L'estimation pertinente des dangers et des risques sanitaires liés à ces cocktails de molécules, impose donc une meilleure connaissance à la fois de l'exposition, du mode d'action et de leur biotransformation pour pouvoir développer des approches expérimentales *in vitro* (modèles cellulaires..) et théoriques (modélisation). Intégrées aux données d'exposition, épidémiologiques et obtenues chez l'animal, ces approches permettront d'optimiser la gestion des risques sanitaires.

Afin d'explorer les concepts, les méthodologies et les modèles qui permettront d'atteindre ces objectifs, trois « chemins de l'effet adverse (AOP ²) » pour l'apparition de la stéatose hépatique, la diminution de la distance anogénitale et la malformation cranio-faciale sont étudiés. La priorisation des produits chimiques pour les essais *in vitro* est fondée sur les modèles *in-silico* (quantitatifs), la relation structure-activité (QSAR ³) et l'amarrage moléculaire (docking), le concept de seuil de risque toxicologique (TTC ⁴) et des modèles d'exposition pour identifier les mélanges préoccupants (exposition combinée, exposition agrégée). Environ 1600 produits chimiques de 10 classes chimiques différentes ont été examinés *in-silico*. Les résultats ont été utilisés dans un modèle d'exposition pour établir des priorités en matière de produits chimiques d'essai et/ou de données nécessaires pour l'évaluation des risques liés aux mélanges dans les 3 AOPs. Des essais *in vitro* utilisant les chemins de l'effet adverse sont effectués pour mesurer la puissance des produits chimiques. Sur la base des

² AOP: Adverse outcome pathway;

³ QSAR: Quantitative structure-activity relationship

⁴ TTC: Threshold of toxicological concern

modèles d'exposition des mélanges ont pu être établis pour étudier la pertinence de l'hypothèse par défaut de l'addition des doses (approche protectrice) pour des produits chimiques ayant un mode d'action similaire ou dissimilaire. Les résultats des essais *in vitro* seront vérifiés/validés par rapport à des expériences *in vivo* dans une étape ultérieure.

Bien que les essais *in vitro* permettent de générer de manière rapide de nouvelles données de danger pour des produits chimiques non encore testés, leurs résultats doivent être extrapolés à partir des concentrations d'exposition internes aux doses externes, avant d'être utilisés dans l'évaluation des risques des mélanges. Pour cela, 9 modèles PB-TK⁵ (ou IVIVE⁶) spécifiques et un modèle générique ont été développés.

EuroMix vise à établir une boîte à outils accessible à la communauté scientifique (chercheur, industriel, réglementation). Par conséquent, les données obtenues à partir des modèles *in silico* et des essais *in vitro*, ainsi que de nouveaux modèles pour les PB-TK et l'évaluation des dangers et de l'exposition (combinés et agrégés) seront intégrés dans une boîte à outils EuroMix en ligne. La boîte à outils EuroMix (<https://www.euromixproject.eu/news/>) produira des données et des modèles permettant 1) la classification en groupes d'évaluation cumulative (CAG⁷) sur la base des AOPs testés, 2) l'utilisation de données *in silico* et *in vitro* dans l'évaluation des risques liés aux mélanges (MRA⁸), 3) l'exécution de secteurs réglementaires globaux de MRA et 4) intégrer les données sur les dangers et l'exposition dans une marge d'exposition (MOE⁹) conformément à une évaluation par paliers telle que décrite dans les lignes directrices internationales. Des études de cas pour l'évaluation combinée et agrégée de l'exposition à l'aide de cette boîte à outils ont été réalisées.

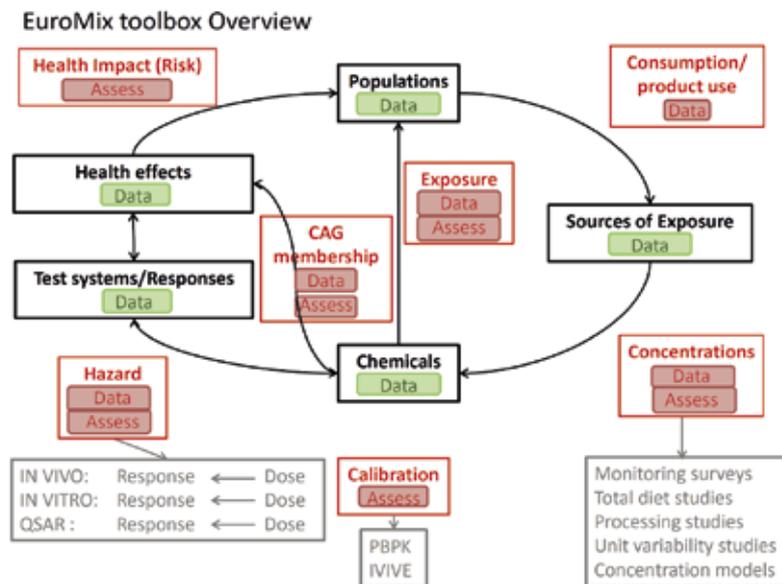


Figure 1 : Représentation de la ToolBox Euromix (simplifié)

⁵ PB-TK : Physiologically-based toxicokinetic

⁶ IVIVE : In vitro to in vivo extrapolation

⁷ CAG : Cumulative assesment group

⁸ MRA : mixture risk assessment

⁹ MOE : Margin of exposure

En ce qui concerne l'exposition agrégée, trois études de cas ont été réalisées pour plusieurs pesticides, les bisphénols (A, S, F et SF) et les pyréthroïdes. Une étude de cas portant sur l'exposition combinée aux pesticides, aux additifs et aux contaminants, à titre d'exemple d'évaluation des risques liés aux mélanges dans tous les secteurs réglementaires, est en cours. Une étude de biosurveillance humaine axée sur les substances pertinentes pour l'exposition globale a été finalisée. Les échantillons biologiques, l'information sur la consommation alimentaire et l'utilisation des cosmétiques ont été obtenus des auprès du panel des volontaires participants à cette étude et l'analyse des échantillons, ainsi que l'interprétation des données sont en cours. L'accès aux outils sera facilité par la formation. Des conseils pratiques sur la manière d'utiliser les tests et les modèles conformément à l'évolution internationale seront fournis. La diffusion et l'harmonisation de l'approche seront assurées par la participation d'experts clés et de l'EFSA, de l'OMS et de l'US-EPA et par quatre ateliers d'harmonisation. On s'attend à ce que cette nouvelle stratégie d'essai, les tests *in vitro*, l'utilisation de la boîte à outils du modèle en ligne et les « guidances » pour son utilisation :

- Stimulent l'innovation dans les secteurs public et privé ;
- Fournissent une base scientifique solide pour la gestion des risques que présentent les mélanges chimiques pour la santé publique ;
- Réduisent au bout du compte l'utilisation d'animaux de laboratoire ;
- Soutiennent le débat mondial sur les politiques d'évaluation des risques pour les mélanges.

3. Choix des molécules et mélanges

Par notre environnement et notre alimentation nous sommes exposés à une grande variété de substances pouvant avoir des effets combinés. Selon l'étude de l'alimentation totale 2 (Anses, 2011), ne serait-ce que par l'alimentation, cela concerne aux environs de 200 pesticides, 30 contaminants inorganiques et minéraux, 10 additifs, 10 phytoestrogènes, 20 mycotoxines, 50 dioxines, PBs, furanes et des retardateurs de flammes bromés (liste non exhaustive).

L'organisation du projet Euromix a confié au Workpackage 2 (WP2) d'identifier les composés (pesticides, biocides, additifs, mycotoxines et autres produits chimiques, ...) et de catégoriser ces molécules en termes de CAGs (entrant dans l'AOP stéatose hépatique) sur la base des données : de la littérature et toxicologique (data mining) et de modèles *in silico*. Ces données ont été croisées avec celles obtenues par le WP5 qui en utilisant les données d'exposition, a permis d'identifier les mélanges (agrégés et combinés) d'intérêt pour l'AOP stéatose (mais également pour les deux autres AOPs : distance anogénitale et la malformation cranio-faciale) (Figure 2).

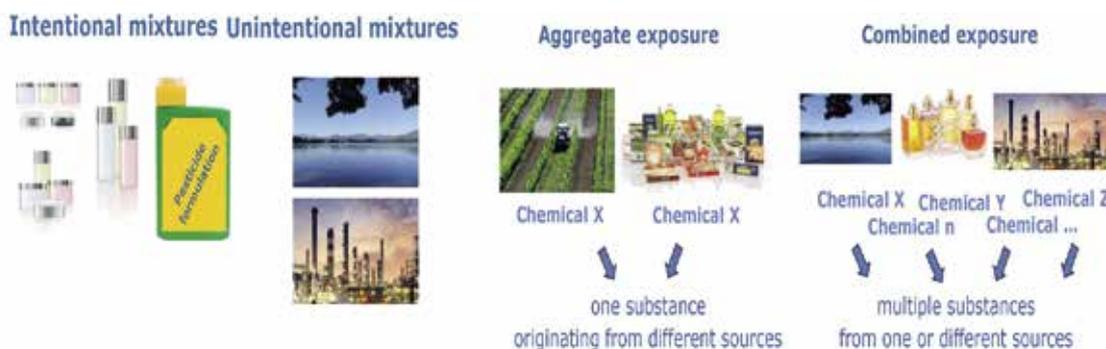


Figure 2 : Voies d'exposition de la population.

4. L'équipe Toxalim (TCMX) est impliquée dans deux WorkPackages

Dans le cadre du Workpackage 3, l'équipe s'applique à développer les bioessais en utilisant une nouvelle technologie (High Content Analysis HCA). L'HCA s'attache à analyser/quantifier la modification du phénotype cellulaire en réponse à des xénobiotiques et quantifier l'hétérogénéité de la réponse.

Les données générées (dose réponse, apparition des gouttelettes lipidiques) sur les molécules choisies (seules et en mélange ; modes d'action similaire et dissimilaire) seront modélisées par le logiciel Proast d'utilisation libre (<https://www.rivm.nl/en/proast>).

Le deuxième (WP4) s'inscrit dans le développement de modèles PB/PK et s'attache à étudier le métabolisme de plusieurs molécules sur des hépatocytes humains et de rat dans le but d'extrapoler ces données à une situation *in vivo*.

4.1 Technologie

Le criblage de type HCS (High Content Screening), utilise un Arraysan (Cellomics). Il s'agit d'un instrument dédié à l'acquisition, à la mesure et à l'analyse multiparamétriques du contenu cellulaire d'un grand nombre d'échantillons. Il intègre un microscope automatisé (Carl Zeiss) et de caméra à haute sensibilité pour l'analyse d'échantillons fixées ou vivants aux formats plaques 96 puits (ou 384). Ainsi, il permet de mener des études qui s'intéressent à la modification du phénotype cellulaire en réponse à des toxiques sur la base de l'analyse à haut débit après acquisition des images. Dans le projet Euromix, nous nous sommes attachés à étudier l'apparition des gouttelettes lipidiques par l'utilisation de composés fluorescent (nile red, Dapi) il est possible d'analyser et de quantifier plusieurs composants cellulaires (noyaux, lipides et phospholipides selon trois couleurs) (Figure 3).

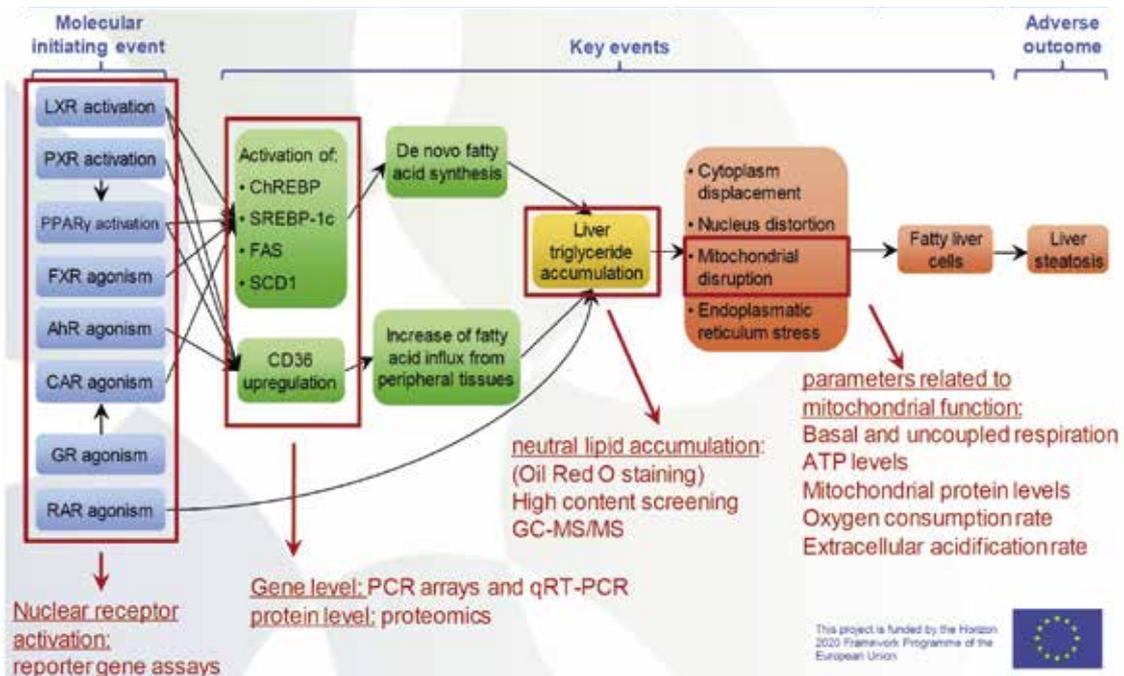


Figure 3 : Chemin de l'effet adverse pour l'apparition de la stéatose hépatique. Les paramètres qui sont étudiés sont en rouge.

4.2 Le modèle cellulaire HepaRG

Même si les hépatocytes humains en primo-culture restent le « gold model » pour les études de toxicologie *in vitro*, ce modèle souffre d'inconvénients majeurs : difficulté d'approvisionnement, durée de vie limitée en culture et des pertes de fonctionnalité rapide. Nous avons de ce fait aussi utilisés les cellules HepaRG (Guillouzo et al., 2007), après différenciation, se divisent en deux populations : des cellules de type hépatocytes et de type cholangiocytes. Ce choix a été dicté par la nécessité d'homogénéiser les protocoles entre les différents laboratoires chargés des études *in vitro* (études des différents « Key events »). Les HepaRG (population hépatocytaire) expriment la grande majorité des fonctions des hépatocytes humains, de façon stable ce qui permet des expositions prolongées aux xénobiotiques. Ces cellules accumulent de façon naturelle (comme les hépatocytes humains) des lipides et les stockent en gouttelettes dans leur cytoplasme.

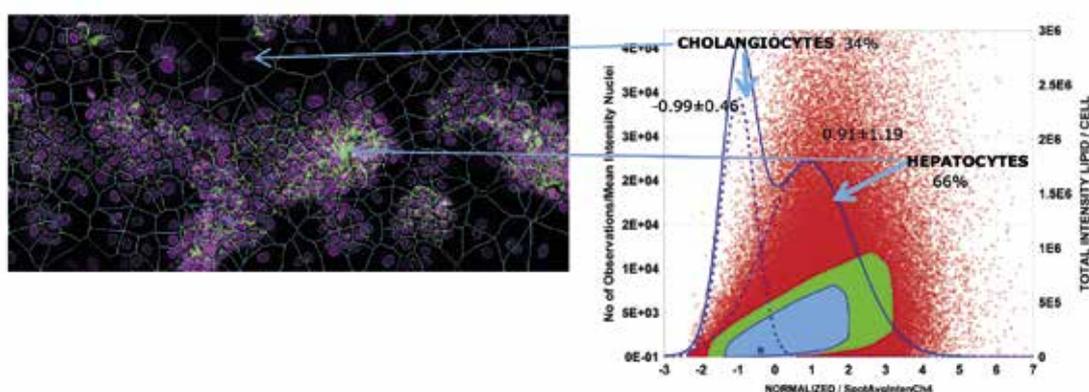


Figure 4 : Les cellules HepaRG accumulent des gouttelettes lipidiques (traitement cyclosporine : contrôle positif). Après avoir délimité les surfaces cellulaires, les intensités nucléaires (fuchsia) et les intensités des gouttelettes lipidiques (vert) dans chaque cellule sont quantifiées. L'intensité moyenne des noyaux permet de distinguer les cholangiocytes (faible intensité) de la population hépatocytaire (forte intensité) (distribution bimodale, tracé bleu). On note que l'accumulation des gouttelettes lipidiques se fait majoritairement dans les hépatocytes (point rouge : intensité moyenne dans une cellule).

Le fait d'analyser les effets induits dans chaque cellule conduit à des fichiers de plusieurs centaines de milliers de lignes sur plus de 10 paramètres. Ces analyses impliquent des traitements statistiques bien différents que l'analyse des effets sur une population cellulaire dans sa globalité.

4.3 Molécules choisies

Nous avons appliqué cette technologie à la problématique du programme Euromix. Il s'agit dans la première étape, comme cela a été précisé précédemment, de s'approcher de l'exposome : « l'intégration sur la vie entière de l'ensemble des expositions qui peuvent influencer la santé humaine ». Cette notion fait partie intégrante d'un projet de loi « de modernisation de notre système de santé » (Texte adopté n° 650, 17 décembre 2015). Ceci constitue l'étape la plus cruciale : définir l'ensemble des molécules auxquelles nous sommes exposés. Cette multi-exposition est justement pratiquement impossible à appréhender, il s'agit donc de sélectionner les plus pertinentes. La deuxième étape est de faire évoluer les concepts méthodologiques qui nous permettront d'anticiper des effets mélanges. L'orientation actuelle est de mieux cerner les mécanismes biologiques et les

étapes qui mèneront à l'apparition d'une pathologie. A partir de modèles expérimentaux *in silico* et *in vitro*, le danger d'un mélange pourra être caractérisé sans avoir à utiliser des animaux (nécessité de limiter l'expérimentation animale). Ainsi pour mieux répondre aux attentes, les cadres conceptuels de la recherche du mode d'action (Mode Of Action : MOA) et des chemins de l'effet adverse (Adverse Outcome Pathway : AOP) et de la modélisation ont été appliqués à l'apparition de la stéatose hépatique

Dans un premier temps nous avons validé notre approche cellulaire sur une molécule modèle : le cyproconazole testé en temps et dose dépendance (Luckert et al., 2018). Nous avons ensuite étendu notre recherche à un grand nombre de molécules (ayant des modes d'action différents) connues pour induire une stéatose hépatique. Ces études ont aussi été menées sur des hépatocytes humains. Nous avons donc pu classer les molécules leur « Relative Potency Factor » (PROAST /www.efsa.europa.eu/it/efsajournal/pub/4658). Ces résultats ont servi de base de données pour constituer des mélanges qui ont été testés sur la base de puissance équivalente (Figure 5).

Tableau 1 : Exemple d'un groupe de molécules étudiées dans le cadre des mélanges

Mode d'action similaire : Activation de récepteur nucléaire	Mode d'action dissimilaire
Subset 1 : MOA majoritaire= activation du PXR	Imazalil (PXR,AhR, CAR, RAR)
	Thiacloprid (PXR,PPAR)
	Fenpyroxymat (PXR)
	Cyclosporin A
	Clothianidin

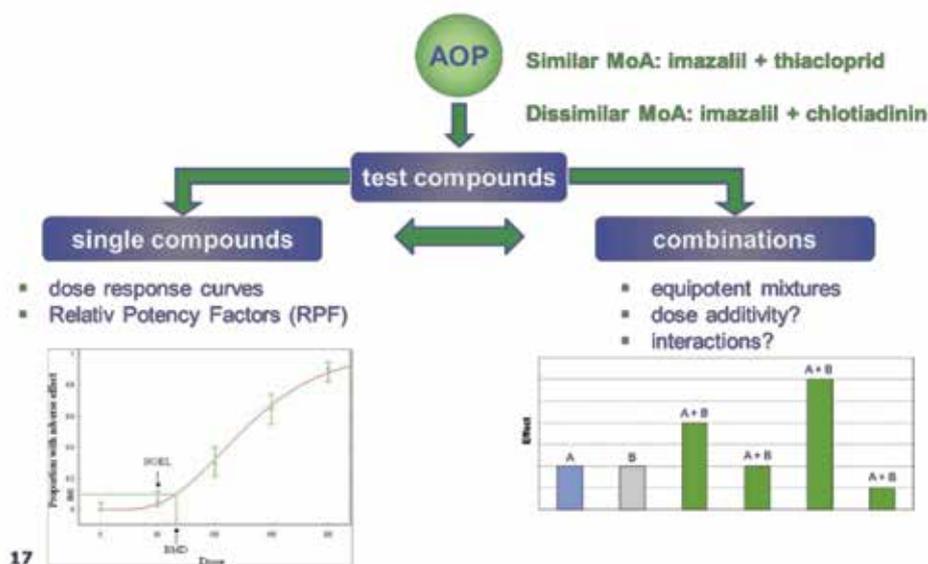


Figure 5 : Concept du test : les doses réponses de chaque molécule permet de calculer les RPF.
Les mélanges sont créés sur la base de puissance équivalente.
La modélisation de l'effet mélange est effectué selon le modèle de dose addition.

5. Quelques résultats marquants

5.1 Mélange et stéatose hépatique

5.1.1 Etape de validation

Une étude de cas a été effectuée en prenant comme molécule modèle le cyproconazole. Il s'agissait d'appliquer le principe défini dans la ToolBox d'Euromix c'est à dire suivre la voie de l'AOP de la stéatose hépatique. Cette toolbox comprend des essais *in vitro* pour mesurer l'activation de récepteurs nucléaires, l'expression des gènes et des protéines, l'accumulation de lipides, la respiration mitochondriale et la formation de cellules hépatiques grasses. Les cellules HepaRG exposées au cyproconazole, un fongicide induisant la stéatose chez les rongeurs. Le cyproconazole active de façon dose dépendant les récepteurs RAR α et PXR, deux événements moléculaires initiateurs dans l'AOP stéatose. De plus, le cyproconazole a provoqué une perturbation des fonctions mitochondriales et induit une accumulation de triglycérides et la gouttelette lipidique. Nous étudions aussi le métabolisme de cette molécule sur des modèles d'hépatocytes humains et de rat ainsi que sur la lignée HepaRG. Des expérimentations menées *in vivo* (rat) sont en cours compiler l'ensemble de ces données et valider l'extrapolation *in vitro/in vivo* de nos résultats (ToolBox Euromix).

L'effet du cyproconazole sur l'accumulation de lipides dans les HepaRG étant publiés, démontrant la validité du modèle, des résultats plus récents sur hépatocytes humains sont présentés montrant l'extrapolation des données des lignées cellulaires aux cellules primaires. L'analyse à haut contenu démontre qu'il existe au niveau des hépatocytes une hétérogénéité au niveau basal qui perdure après stimulation. Cela se traduit par une dispersion importante (autour de la médiane) mais qui est reproductible.

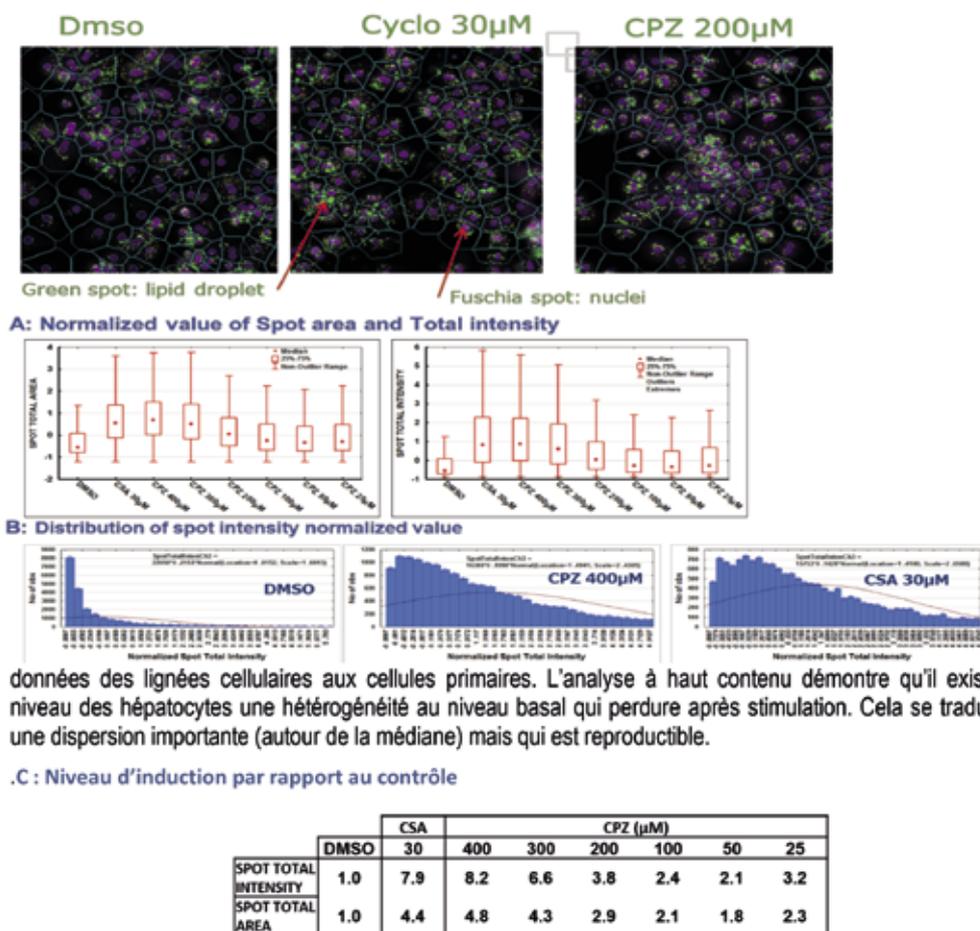


Figure 6 : Le cythroconazole induit une accumulation de lipides dans les hépatocytes humains cryoconservés (3 fois indépendants). Les hépatocytes humains ont été ensemencés dans 96 plaques multipuits. Après 24 heures, les cellules ont été exposées à 0,5 % de DMSO, CSA et CPZ (400µM à 25µM). Après 24 heures d'exposition, les lipides neutres ont été révélés par le rouge du Nil, puis soumis à une analyse HCS. L'aire totale et l'intensité des taches ont été quantifiées dans chaque cellule, puis normalisées selon la MAD médiane.

A représente la relation dose-réponse pour la surface totale et les intensités (médiane [25 % à 75%]) des gouttelettes lipidiques. **B** illustre la distribution de l'intensité totale ponctuelle normalisée au sein des hépatocytes.

C Niveau d'induction par rapport au contrôle.

5.1.2 Apport supplémentaire de la technologie HCS

L'analyse d'image permet de quantifier les effets phénotypiques au niveau de la cellule. Les analyses peuvent être approfondies pour différencier des modes d'actions différents selon les molécules étudiées. La Figure 7 représente les images acquises après traitement de cellules HepaRG, par le T09 et par la cyclosporine (CSA). Ces deux molécules induisent l'accumulation de gouttelettes lipidiques (comparé au contrôle) mais on remarque que si la cyclosporine focalise son action sur la population hépatocytaire, le T09 induit cette accumulation dans la totalité des cellules traitées. L'analyse quantitative de ces données implique des modélisations statistiques qui sont en cours de développement. Elles permettront de clusteriser l'ensemble des molécules selon leurs effets phénotypiques.

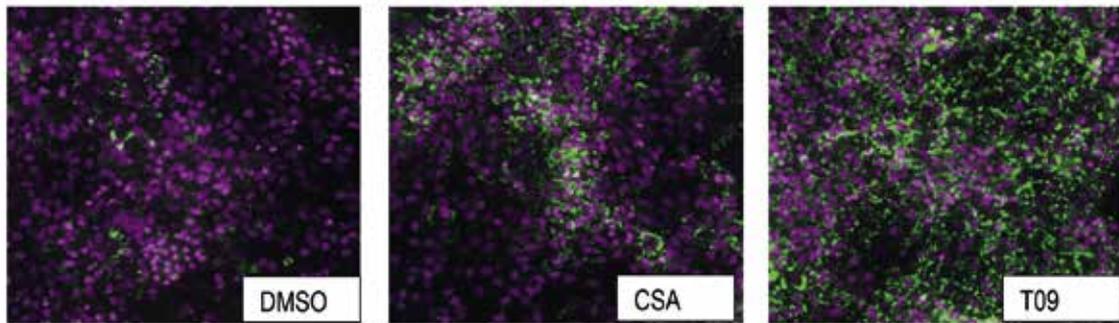


Figure 7 : Microphotographie de cellules HepaRG après 72 heures d'exposition à la CSA et T09 (contrôle Dms0)

5.2 Le modèle de dose addition peut-il rendre compte des effets de mélange contenant des molécules ayant des modes d'action différents

Après avoir constitué les mélanges (binaires et un mélange ternaire) et calculé les différentes proportions de chaque composé (à partir des courbes doses réponses de chaque molécule), pour respecter les puissances équivalentes, les expérimentations sur la lignée HepaRG ont été effectuées à 24 et 72 heures. Néanmoins, il a fallu réduire les données générées par l'analyse à haut contenu pour pouvoir utiliser le « Benchmark Dose modelling software PROAST » et analyser la déviance à la dose addition (ie : supra-additivité (synergisme), infra-additivité (antagonisme)).

Sur l'ensemble des mélanges testés, le modèle de dose addition semble être un mécanisme commun au moins dans le cas des effets stéatotique. La Figure 8 représente les données obtenues sur trois molécules ayant des mécanismes d'action différents (Tableau 1). Ces travaux ont été menés sur d'autres mélanges et démontrent que l'application du modèle de dose addition, même pour des molécules ayant des MOAs différents, reste en première approche le modèle le plus protecteur.

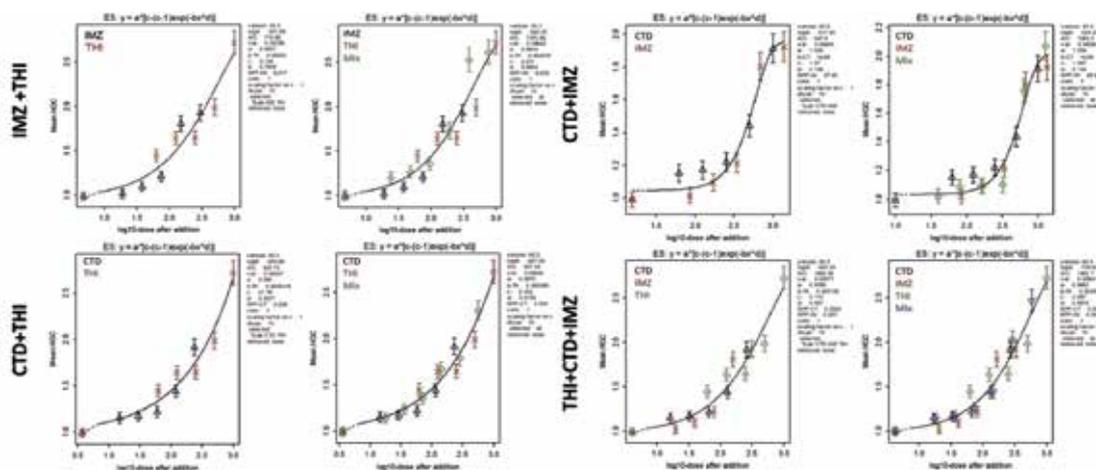


Figure 8 : Application du modèle de concentration addition : pour les combinaisons binaires la courbe noire, représente la courbe théorique de l'effet mélange obtenue (modélisée) à partir des données de chaque molécule. Celle-ci corrèle parfaitement avec les points expérimentaux (vert) obtenus en traitant les cellules avec le mélange des deux composés. Pour le mélange ternaire la courbe noire représente la courbe théorique qui se superpose aux données expérimentales (bleu). IMZ : imazalil, THI : thiaclopride, CTD : clothianidin.

5.3 Modélisation PB/TK

Nous sommes en cours de finalisation des expérimentations de métabolisation (Dienestrol, Linuron, imazalil, cyproconazole, thiaclopride et clothianidin) sur hépatocytes humains et de rat mais aussi sur les cellules HepaRG. Les données (Km, Vm et temps de demi-vie) permettront d'alimenter les différents modèles PB/TK IVIVE de la ToolBox.

CONCLUSIONS

Il ne fait plus de doutes maintenant, qu'il faut évaluer les dangers et les risques des produits chimiques non seulement en tant que substance unique mais dans la complexité des expositions et des effets mélanges.

Au cours des dernières années, de nombreux programmes de recherche ont été menés permettant de mieux comprendre les risques liés à l'exposition combinée à de multiples produits chimiques ayant des modes d'action différents (Kortenkamp et Faust, 2018). Des méthodes ont été développées et utilisées pour mieux évaluer ces risques.

Mais il reste cependant de nombreuses lacunes à combler :

- La première sans nul doute concerne la caractérisation de la composition des mélanges auxquels nous sommes exposés. Cela concerne plus particulièrement les mélanges agrégés (alimentaire, non alimentaire). Cela pose la question du « monitoring », comment connaître la réalité de notre exposition, nous ne pouvons trouver que ce que l'on cherche, il reste donc très difficile d'avoir une vue globale de l'exposome.
- La seconde serait de compléter les données sur les molécules (pris individuellement) car pour certaine il y a un vrai manque sur leur mode d'action.

Il existe au niveau européen (et plus largement mondial) un manque d'harmonisation que les programmes Euromix et Mixtox tendent à combler tant au niveau méthodologique qu'au niveau de l'approche réglementaire. Cela est fait dans le cadre de nombreux workshop dont le but est de revoir les différents règlements dans les divers secteurs de la chimie au travers des différentes régions. Pour réussir ce challenge il faudra la mobilisation de nombreux acteurs de ce secteur : états, instituts chercheurs, industriels et régulateurs pour que ce type de recherche/programme perdure dans le futur, pour traduire les résultats scientifiques de ce domaine de recherche (Mixture Risk Assessment) en termes de réglementation (Bopp et al., 2018).

Références bibliographiques

- Bopp S.K., et al., 2018. Current EU Research Activities on Combined Exposure to Multiple Chemicals. *Environment International*.
- Demur C., et al., 2013. Dietary Exposure to a Low Dose of Pesticides Alone or as a Mixture: The Biological Metabolic Fingerprint and Impact on Hematopoiesis. *Toxicology*.
- Dervilly-Pinel G., et al., 2017. Micropollutants and Chemical Residues in Organic and Conventional Meat. *Food Chemistry*.
- EU., 2011. Toxicity and Assessment of Chemical Mixtures.
- Guillouzo A., et al., 2007. The Human Hepatoma HepaRG Cells: A Highly Differentiated Model for Studies of Liver Metabolism and Toxicity of Xenobiotics. *Chemico-Biological Interactions*.

Kadar A., et al., 2017. Evidence of in Vitro Metabolic Interaction Effects of a Chlorfenvinphos, Ethion and Linuron Mixture on Human Hepatic Detoxification Rates. *Chemosphere*.

Kienzler A., Bopp S.K., van der Linden S., Berggren E., Worth A., 2016. Regulatory Assessment of Chemical Mixtures: Requirements, Current Approaches and Future Perspectives. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*.

Kopp B., et al., 2018. Genotoxicity and Mutagenicity Assessment of Food Contaminant Mixtures Present in the French Diet. *Environmental and Molecular Mutagenesis*.

Kortenkamp A., Backhaus T., Faust M., 2009. State of the Art Report on Mixture Toxicity. http://ec.europa.eu/environment/chemicals/effects/pdf/report_mixture_toxicity.pdf

Luckert C. et al., 2018. Adverse Outcome Pathway-Driven Analysis of Liver Steatosis in Vitro: A Case Study with Cyproconazole. *Chemical Research in Toxicology*.

de Sousa G., Nawaz A., Cravedi J.P., Roger Rahmani R., 2014. A Concentration Addition Model to Assess Activation of the Pregnane X Receptor (PXR) by Pesticide Mixtures Found in the French Diet. *Toxicological Sciences*.

Update: use of the benchmark dose approach in risk assessment, www.efsa.europa.eu/it/efsajournal/pub/4658





Pour en savoir plus

inra.fr/ciag