



# Génotoxicité des multi-expositions à des produits agroalimentaires - Aspects pratiques



Dr. Audebert Marc,  
UMR1331 Toxalim, Toulouse, France



24 Novembre 2017

# La problématique des mélanges chimiques

→ **Définition** : mélange chimique « ensemble de substances, identifiées ou non, indépendamment de leur source ou de leur proximité temporelle ou spatiale, qui peuvent contribuer de façon conjointe à la toxicité dans la population d'étude » (US EPA, 2000).

L'a  
(pe  
vé

es  
nts



# Projet EATox

Peu d'études sur les effets toxiques des mélanges de contaminants *in vitro*.

- Définition des mélanges. Besoin de disposer d'une méthodologie robuste.
- Modèles cellulaires adaptés et outils d'analyse à haut-débit.
- Avoir une analyse mathématique et statistique adéquate des résultats.



## Mise en place du projet EATox (suite PERICLES)



- Détermination des mélanges de contaminants présents dans l'alimentation française.
- Evaluation des effets toxiques (cytotoxicité et génotoxicité) des mélanges sur des cellules humaines.
- Etude des effets « mélanges/cocktail » des contaminants.



**Métaux lourds**



**Pesticides**

## **Possible contaminants alimentaires**



**Mycotoxines**



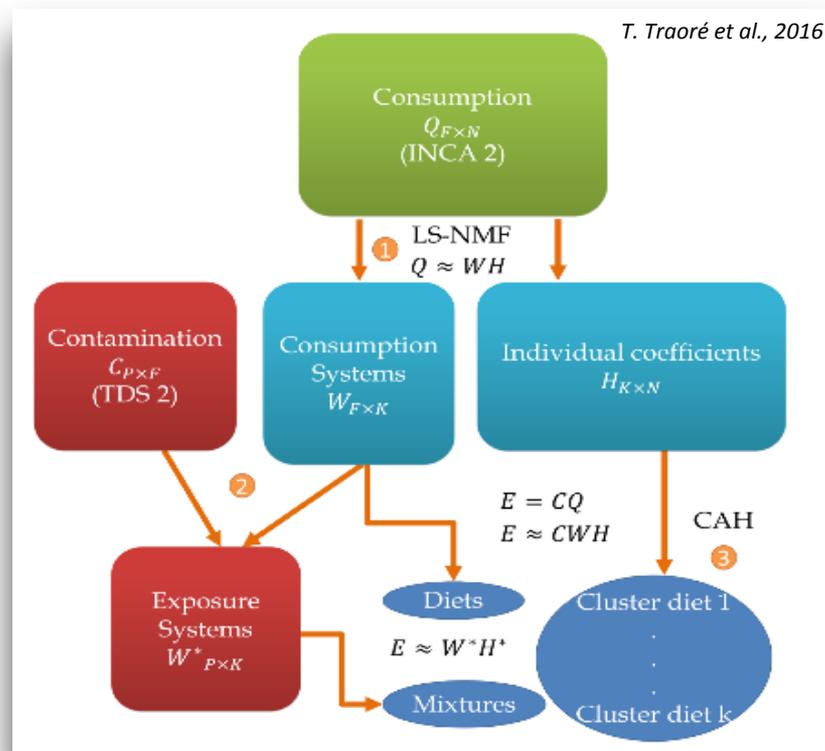
**Autres xénobiotiques (HAP...)**



# Identification des mélanges de contaminants alimentaires

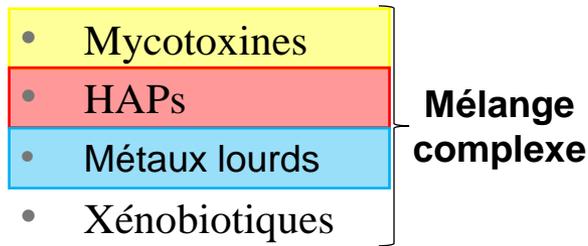
Tâche effectuée avec le groupe d'expert de la DER de l'ANSES

- La seconde **Etude de l'Alimentation Totale française (EAT2)** permet d'évaluer l'exposition d'un grand nombre de contaminants (métaux lourds, HAPs, pesticides, toxines...)
- Groupés avec des données de **consommation (INCA2)**, l'ANSES a défini plusieurs mélanges présents dans l'alimentation
- **6 mélanges** ont été obtenus en se basant sur la factorisation par matrices non-négatives



# Exemple de mélange de contaminants alimentaires

## Mélange 1

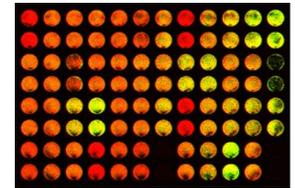


Nom long	Moyenne ( $\mu\text{g}/\text{kg bw}/\text{d}$ )	% moyen (masse)	proportion moléculaire <i>% moyen (mol)</i>
Mycotoxin HT-2	0,008170	0,09663	0,0242
Pyrene	0,006510	0,07699	0,0405
Cadmium	0,150000	1,77406	1,6774
Tellure	0,030000	0,35481	0,2955
Bisphénol A	0,048000	0,56770	0,2643
Cobalt	0,170000	2,01060	3,6277
Deoxynivalenol	0,389000	4,60073	1,6500
Zearalenone	0,005780	0,06836	0,0228
Plomb	0,160000	1,89233	0,9706
Barium	5,570000	<b>65,87678</b>	<b>50,9898</b>
NIVALENOL	0,026800	0,31697	0,1079
Fluoranthene	0,002680	0,03170	0,0164
Nickel	1,880000	<b>22,23489</b>	<b>40,2549</b>
Phenanthrene	0,008240	0,09746	0,0581

- **Mélanges complexes**, 10-20 molécules avec des mécanismes d'action différents (HAP, mycotoxines, pesticides, métaux lourds) pas tous clairement définis.
- **Reproduire** les mélanges de la DER en respectant les proportions moléculaires de chaque contaminant.



# Application du test $\gamma$ H2AX ICW aux contaminants alimentaires



$\gamma$ H2AX est un indicateur globale de génotoxicité: détecte les composés génotoxiques avec différents modes d'action génotoxique (stress oxydant, adduit à l'ADN, inhibiteur de topoisomérase, alkylation, intercalant, inhibiteur pool nucléotidique...).

- **Pesticides** (Graillet *et al.*, Env. Mol. Mut. (2012); Graillet *et al.*, Mut. Res. (2012); Crepet *et al.*, Toxicology (2013))



- **Bisphenols** (Audebert *et al.*, Arch Tox (2011), Riu *et al.*, Toxicology (2011))



- **HAP** (Audebert *et al.*, Tox Letter (2010); Audebert *et al.*, Tox And Appl Pharma (2012))



- **AAH** (Jamin *et al.*, Plos ONE(2013); Chevereau *et al.*, Arch Tox (2017))

- **Bactéries** (Martin *et al.*, Plos Pathogen (2013); Andriamihaja *et al.*, Free Rad. Mol Biol. (2015); Beaumont *et al.*, Free Rad. Mol Biol. (2016))



- **Lipides oxydés** (Bastide *et al.*, Cancer Research (2015); Martin *et al.*, Am. J Clin. Nut. (2013))



- **Métaux** (Kopp *et al.* Env. Mol. Mut. (2017) in press)



- **Mycotoxines, pyrrolizidines alcaloïdes, nanomatériaux, eaux...**

# Etudes des effets toxiques des composés seuls

Test de génotoxicité *in vitro* à haut débit ( $\gamma$ H2AX ICW) sur cellules humaines HepG2 (foie) et LS-174T (colon). Criblage des composés seuls  $\approx$  49 + 15 spéciations métaux + 4 sulfites (additifs).

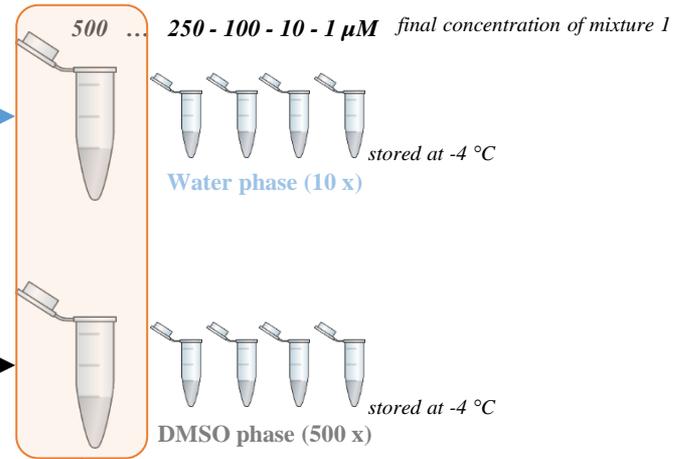
	total	(+) $\gamma$ H2AX	
		HepG2	LS-174T
Métaux	11	4	5
Pesticides	20	1	0
HAPs	10	5	6
Mycotoxines	4	3	0
Autres xénobiotiques	4	1	1
<i>somme</i>	<b>49</b>	<b>14</b>	<b>12</b>

- Résultats en adéquation avec la littérature
- Peu de composés positifs en  $\gamma$ H2AX (24,5-28,5 %)

(Kopp *et al.* Env. Mol. Mut. (2017) in press)

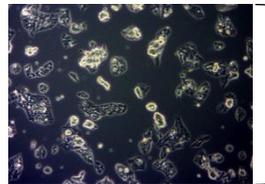
# Etudes des effets toxiques des six mélanges

Nom long	% moyen (masse)	proportion moléculaire	Concentration ( $\mu\text{M}$ )
		% moyen (mol)	500
Mycotoxin HT-2	0,09663	0,0242	0,121
Pyrene	0,07699	0,0405	0,202
Cadmium	1,77406	1,6774	8,387
Tellure	0,35481	0,2955	1,478
Bisphénol A	0,56770	0,2643	1,321
Cobalt	2,01060	3,6277	18,139
Deoxynivalenol	4,60073	1,6500	8,250
Zearalenone	0,06836	0,0228	0,114
Plomb	1,89233	0,9706	4,853
Barium	<b>65,87678</b>	<b>50,9898</b>	254,949
NIVALENOL	0,31697	0,1079	0,539
Fluoranthene	0,03170	0,0164	0,082
Nickel	<b>22,23489</b>	<b>40,2549</b>	201,274
Phenanthrene	0,09746	0,0581	0,291

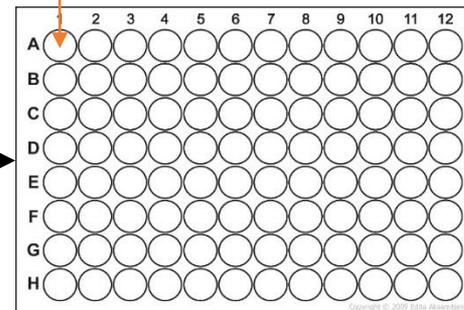


10  $\mu\text{L}$  water phase at 10 X  
 + 10  $\mu\text{L}$  DMSO phase at 10 X  
 + 80  $\mu\text{L}$  medium culture without FBS

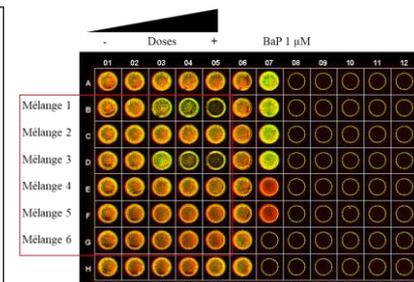
... 250 - 100 - 10 - 1  $\mu\text{M}$



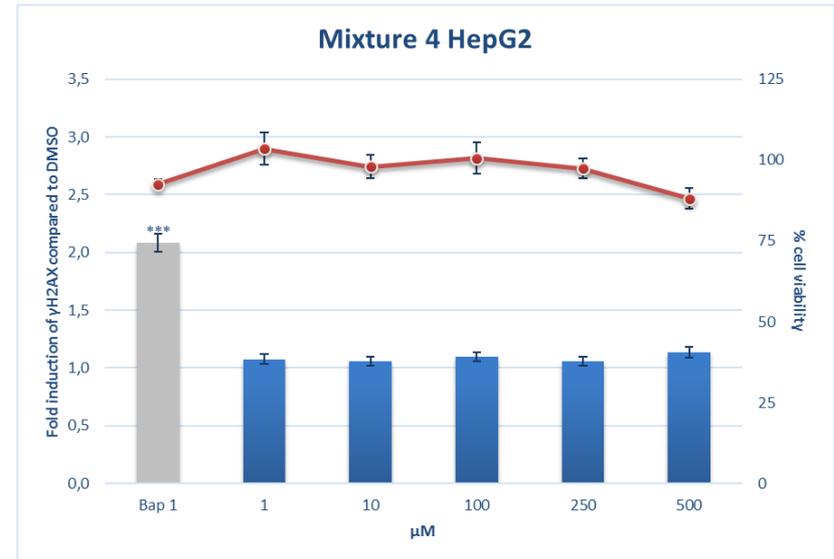
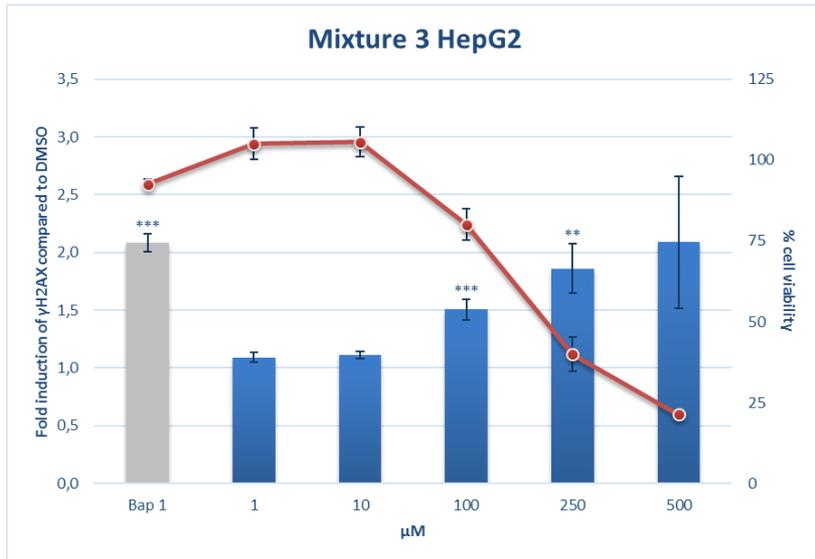
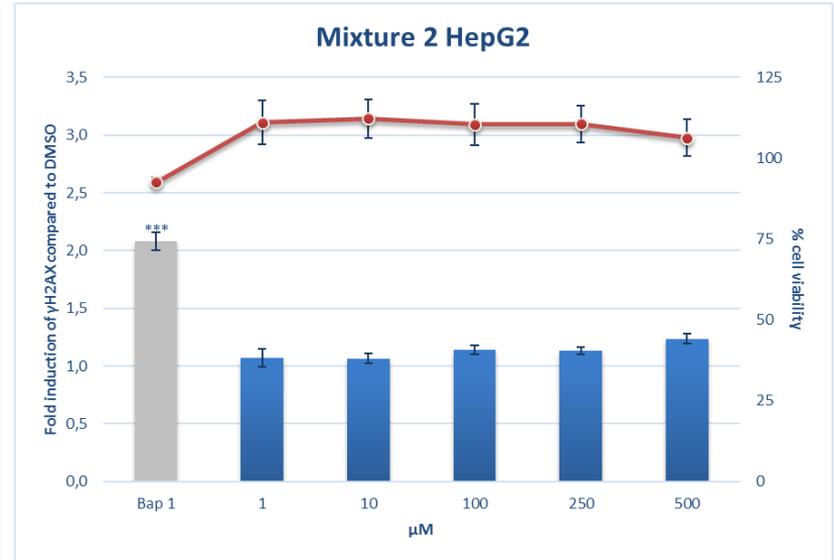
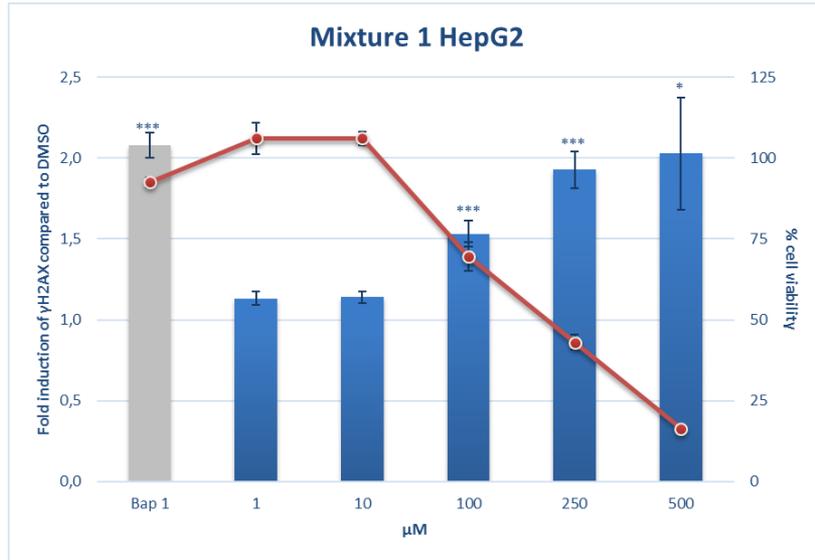
HepG2 cells



$3.2 \times 10^4$  cells /well

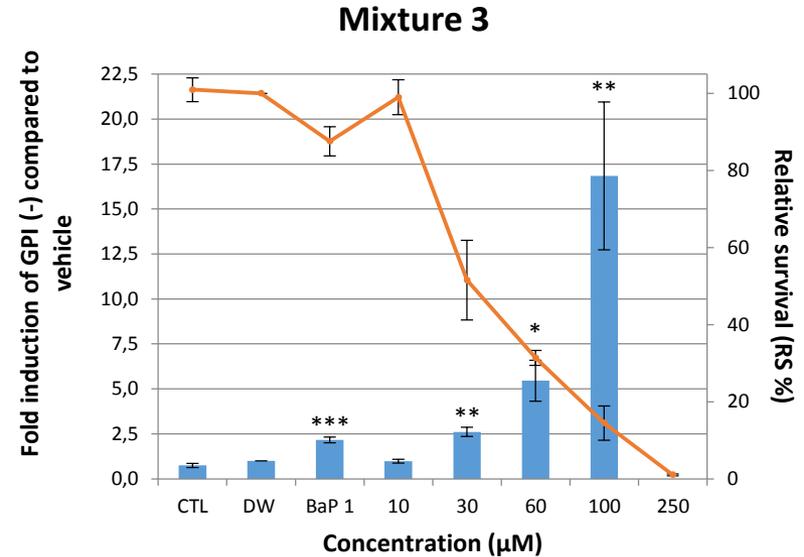
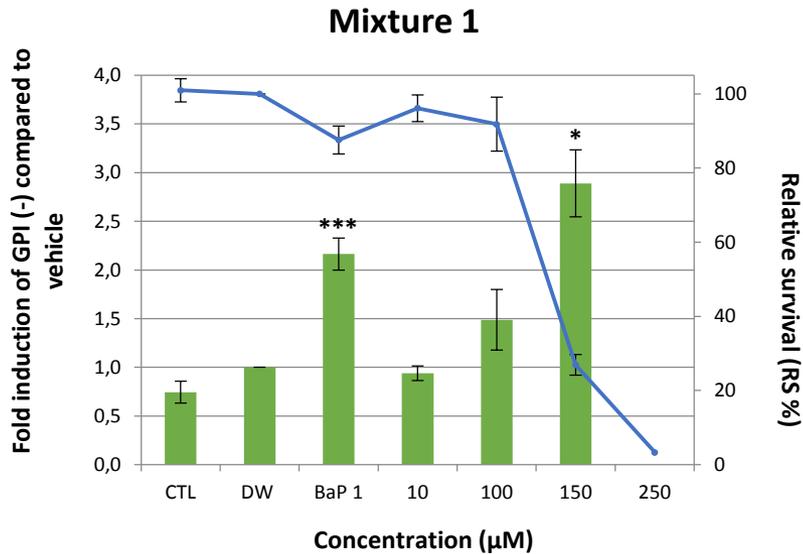


# Résultats sur la lignée cellulaire HepG2



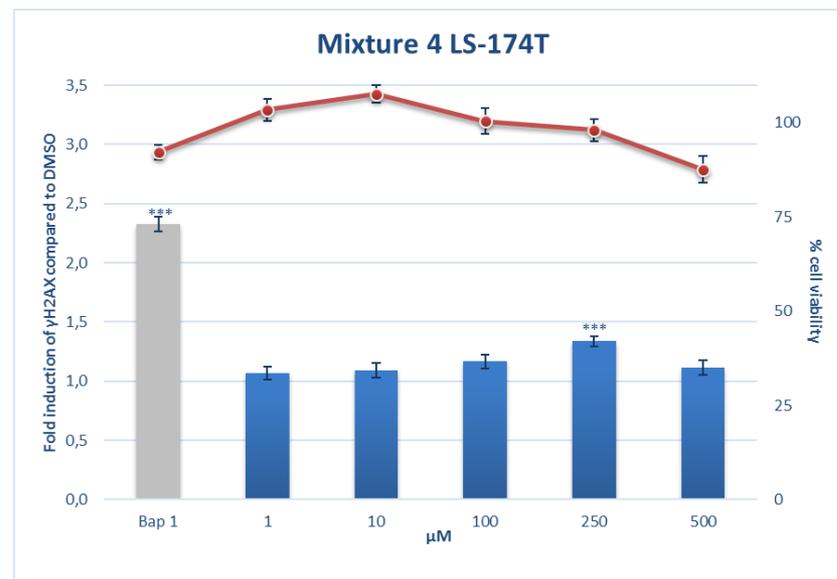
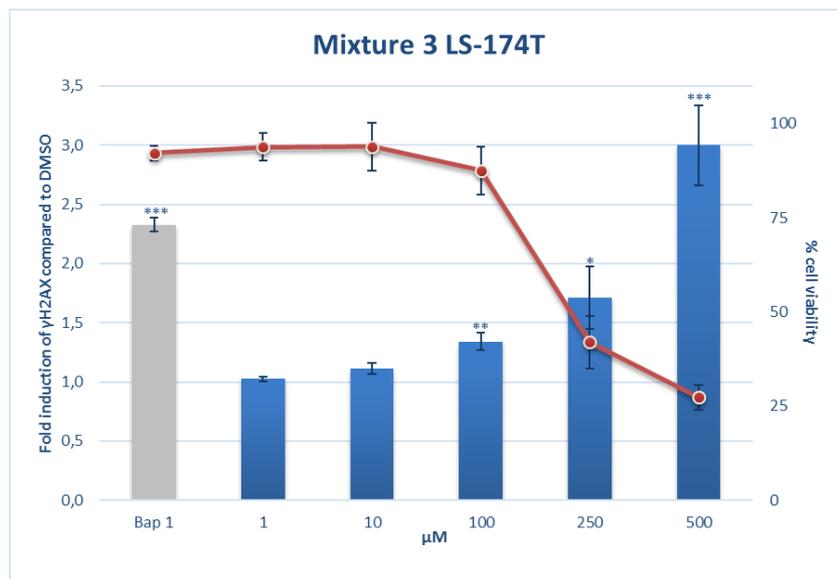
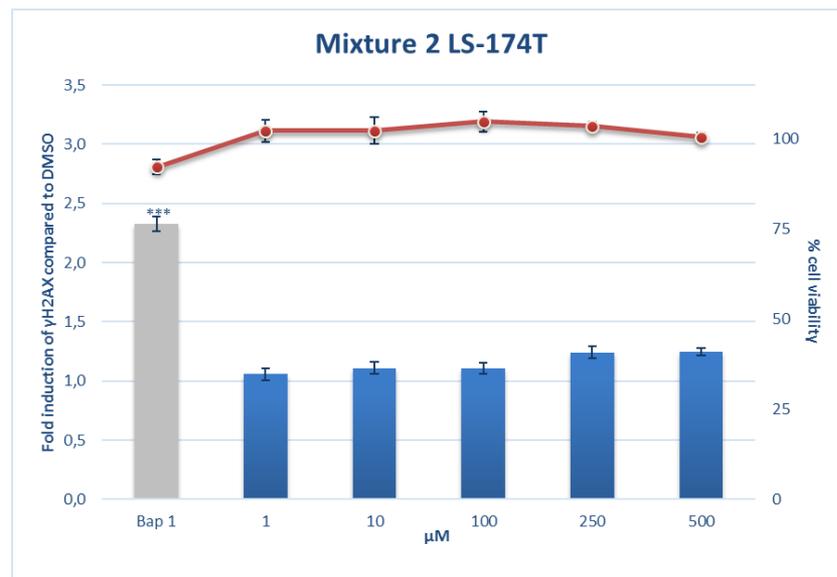
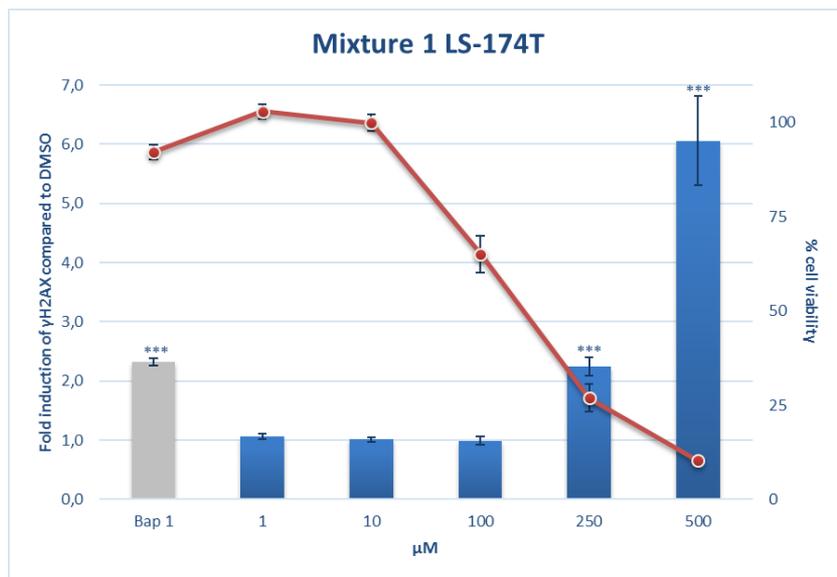
Mesure de la génotoxicité par fold ( $\gamma$ H2AX)  $\pm$  SEM ( $n > 3$ ) durant 24 h de traitement sur cellules HepG2. La viabilité cellulaire est exprimée en % (Moyenne  $\pm$  SEM). Différences significatives sont notées \* ( $P \leq 0,05$ ), \*\* ( $P \leq 0,01$ ) et \*\*\* ( $P \leq 0,001$ ) (test de Student).

# Effets mutagènes des mélanges sur la lignée HepG2



**Induction de mutations sur des cellules humaines par les mélanges de contaminants.**

# Résultats sur la lignée cellulaire LS-174T



Mesure de la génotoxicité par fold ( $\gamma$ H2AX)  $\pm$  SEM ( $n > 3$ ) durant 24 h de traitement sur cellules LS174-T. La viabilité cellulaire est exprimée en % (Moyenne  $\pm$  SEM). Différences significatives sont notées \* ( $P \leq 0,05$ ), \*\* ( $P \leq 0,01$ ) et \*\*\* ( $P \leq 0,001$ ) (test de Student).

# Analyse des effets mélanges sur la lignée HepG2

## Génotoxicité ( $\gamma$ H2AX)

Mixture 1	Concentration ( $\mu$ M)				
	500	250	100	10	1
<b>Mycotoxin HT-2 (0,1)</b>	<b>0,121</b>	0,060	0,024	0,002	0,000
Pyrene	0,202	0,101	0,040	0,004	0,000
<b>Cadmium (25)</b>	8,387	4,193	1,677	0,168	0,017
<b>Tellure (500)</b>	1,478	0,739	0,296	0,030	0,003
Bisphénol A	1,321	0,661	0,264	0,026	0,003
Cobalt	18,139	9,069	3,628	0,363	0,036
<b>Deoxynivalenol (10)</b>	<b>8,250</b>	4,125	1,650	0,165	0,017
Zearalenone	0,114	0,057	0,023	0,002	0,000
Plomb	4,853	2,426	0,971	0,097	0,010
Barium	254,949	127,475	50,990	5,099	0,510
<b>NIVALENOL (10)</b>	0,539	0,270	0,108	0,011	0,001
Fluoranthene	0,082	0,041	0,016	0,002	0,000
Nickel	201,274	100,637	40,255	4,025	0,403
Phenanthrene	0,291	0,145	0,058	0,006	0,001
Mixture ICW $\gamma$ H2AX	<b>2,513</b>	<b>2,302</b>	<b>1,534</b>	1,112	1,102

Molécules seules

**Positif  $\gamma$ H2AX**

Négatif  $\gamma$ H2AX

## Cytotoxicité (% viabilité)

Mixture 1	Concentration ( $\mu$ M)				
	500	250	100	10	1
<b>Mycotoxin HT-2 (1)</b>	0,121	0,060	0,024	0,002	0,000
Pyrene	0,202	0,101	0,040	0,004	0,000
<b>Cadmium (50)</b>	8,387	4,193	1,677	0,168	0,017
<b>Tellure (500)</b>	1,478	0,739	0,296	0,030	0,003
<b>Bisphénol A (50)</b>	1,321	0,661	0,264	0,026	0,003
<b>Cobalt (500)</b>	18,139	9,069	3,628	0,363	0,036
Deoxynivalenol	8,250	4,125	1,650	0,165	0,017
Zearalenone	0,114	0,057	0,023	0,002	0,000
Plomb	4,853	2,426	0,971	0,097	0,010
Barium	254,949	127,475	50,990	5,099	0,510
NIVALENOL	0,539	0,270	0,108	0,011	0,001
Fluoranthene	0,082	0,041	0,016	0,002	0,000
<b>Nickel (750)</b>	201,274	100,637	40,255	4,025	0,403
Phenanthrene	0,291	0,145	0,058	0,006	0,001
Mixture ICW $\gamma$ H2AX	<b>16,44</b>	<b>41,69</b>	69,69	111,81	112,63

Molécules seules

**<30 % viabilité**

>70 % viabilité

Il semble y avoir interaction entre les constituants du mélange :

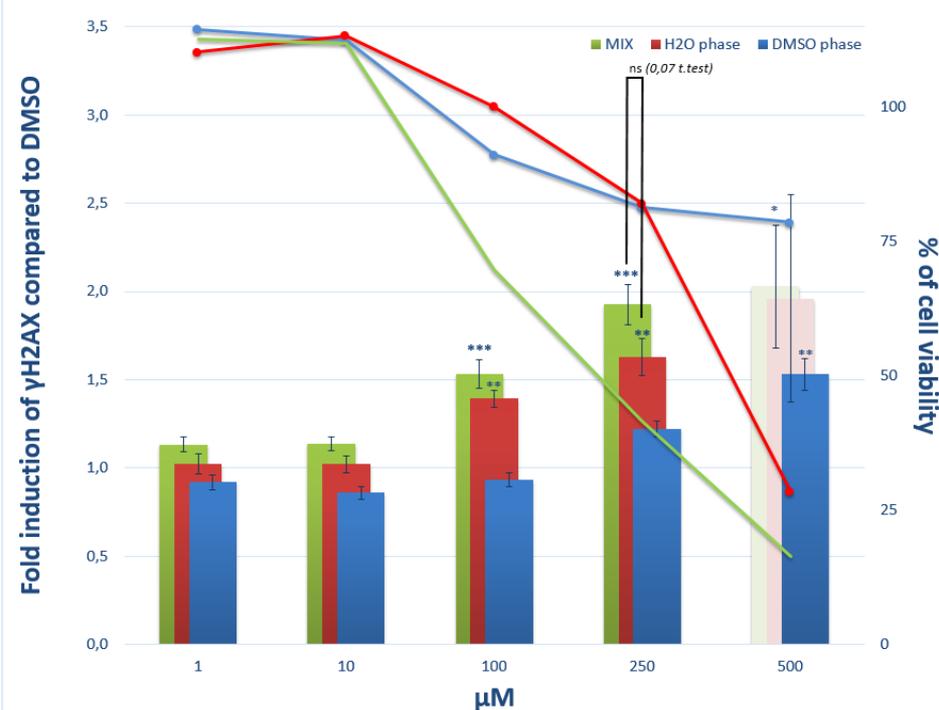
- Soit un effet **synergique**
- Soit un effet de **potentialisation** (substance dépourvue de toxicité augmente la toxicité d'une autre substance)

# Recherche des contaminants responsables des effets

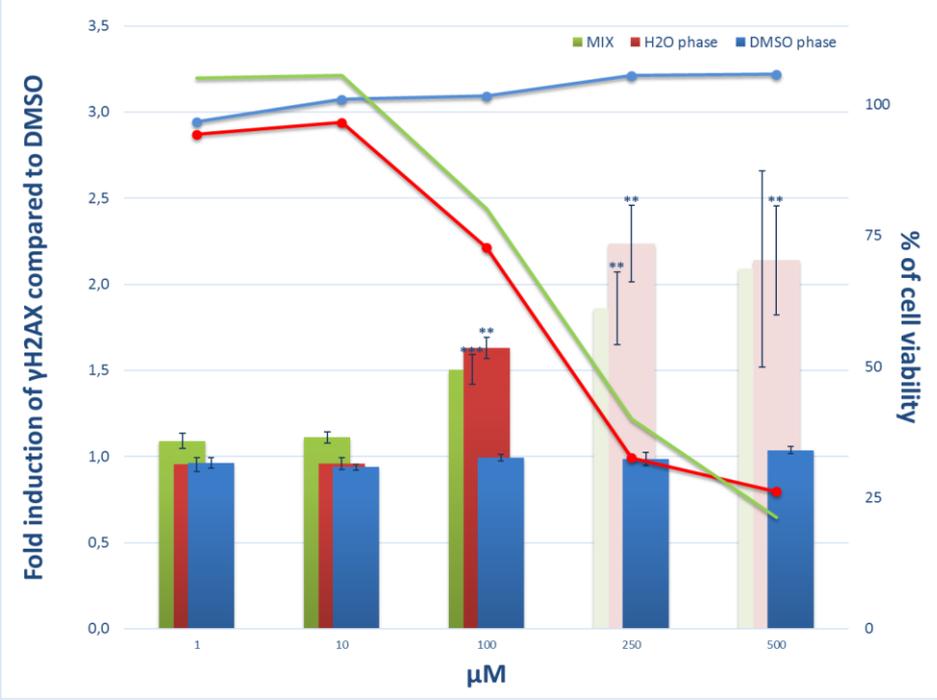
Tester les phases (DMSO-eau) séparément

→ permet de cibler un/des composé(s) responsable(s) des effets

Mixture 1 HepG2 : phase analysis



Mixture 3 HepG2 : phase analysis

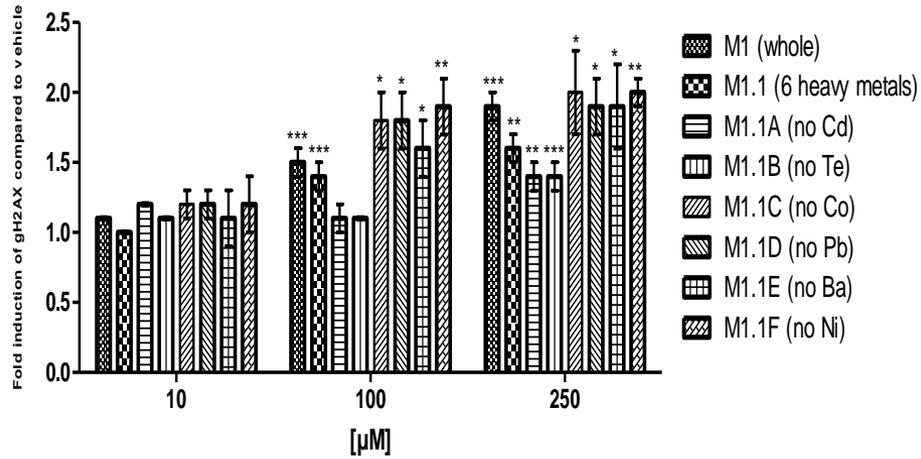


Très bonne corrélation entre les mélanges complexes et leurs **phases H<sub>2</sub>O** (paramètres génotoxicité et cytotoxicité)

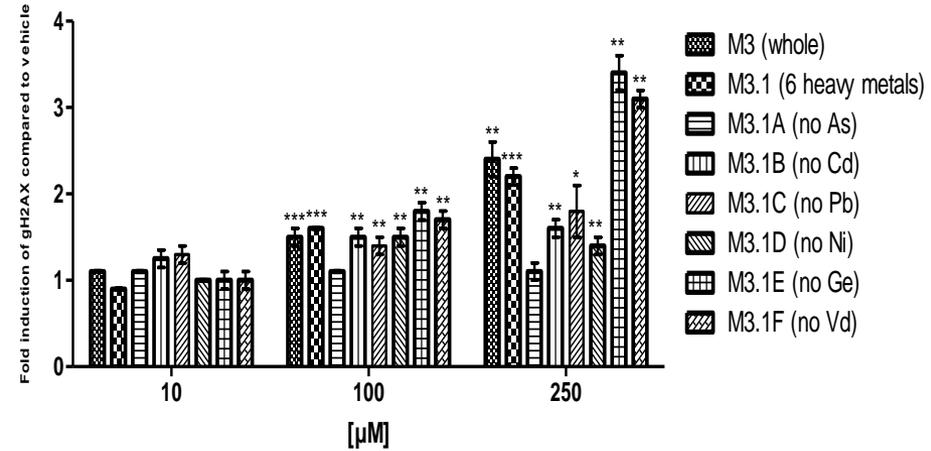
Mesure de la génotoxicité par fold ( $\gamma$ H2AX)  $\pm$  SEM ( $n > 3$ ) durant 24 h de traitement sur cellule HepG2. La viabilité cellulaire est exprimée en % (Moyenne  $\pm$  SEM). Différences significatives sont notées \* ( $P \leq 0,05$ ), \*\* ( $P \leq 0,01$ ) et \*\*\* ( $P \leq 0,001$ ) (test de Student).

# Mise en évidence des métaux

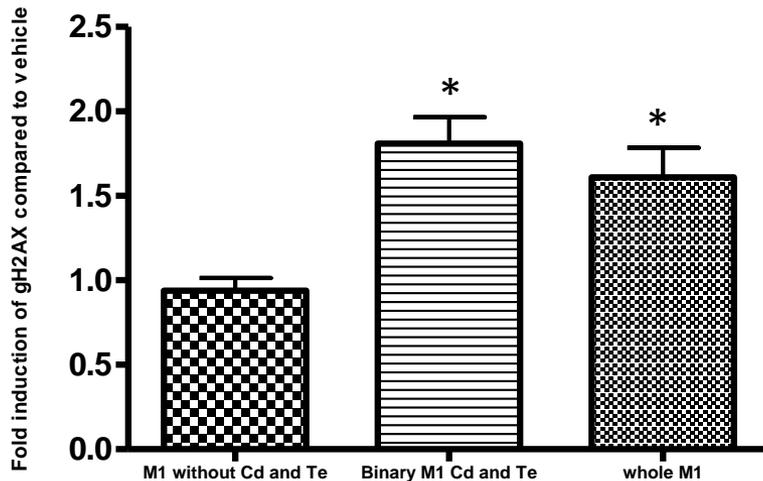
## Mixture 1



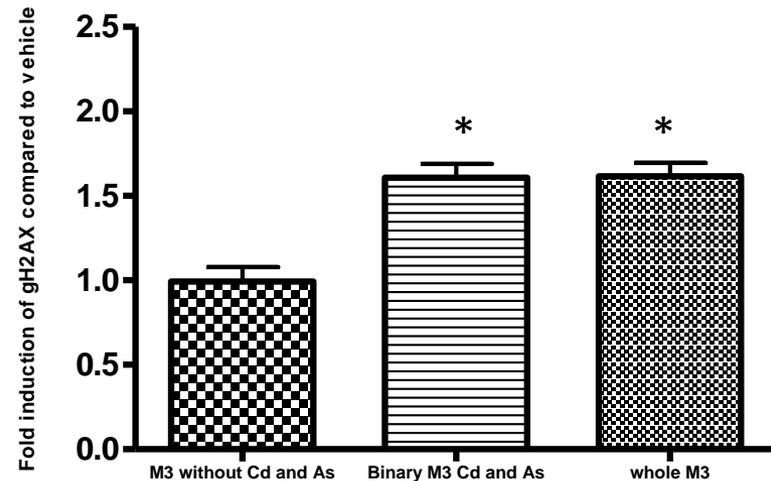
## Mixture 3



## MIX 1 100 μM

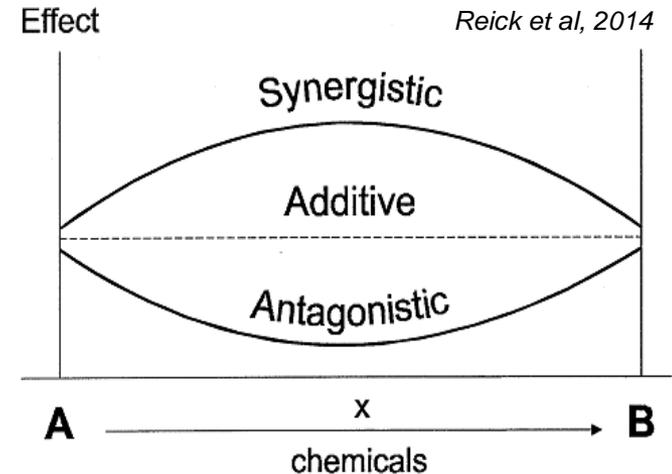


## MIX 3 100 μM



# Stratégies d'analyse des effets mélanges

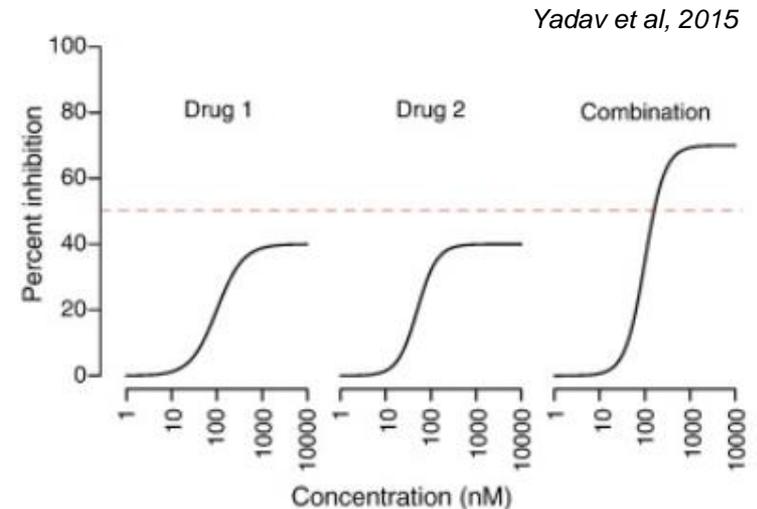
- **Effet additif** : effet égal à la somme des effets de chaque produit pris individuellement (aucune interaction directe) ( $2+3=5$ )
- **Effet synergique** : effet plus grand que la somme des produits ( $2+3>5$ )
- **Effet antagoniste** : effet plus faible que la somme des produits ( $2+3<5$ )



Comparer les effets doses réponse des 6 mélanges avec les effets doses réponses des molécules seules (screening)

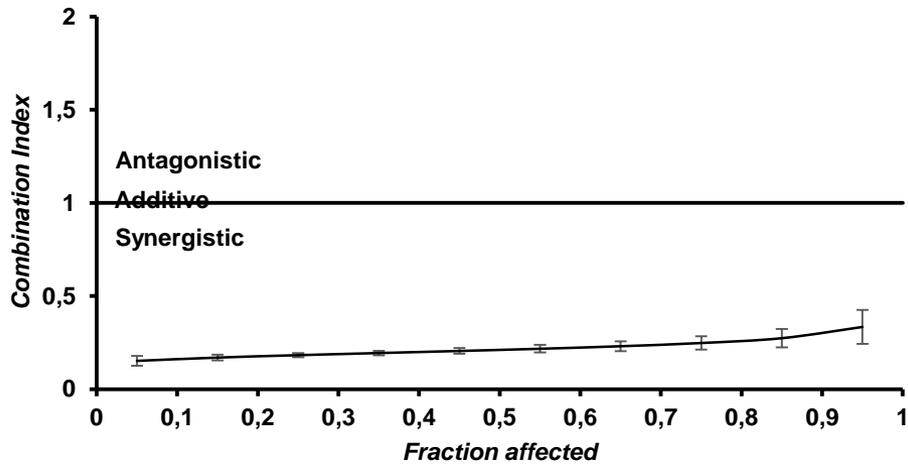
## Stratégies de modélisation:

- Approche statistique utilisant les modèles CA et IA (hybride) (Ermler et al, 2011, 2013; Backhaus and Faust, 2012).
- Plan factoriel, complexe et nécessite beaucoup de points (Groten et al, 1998; Sun et al, 2009).
- REPOSE SOUVENT SUR LE PRINCIPE DE L'ADDITIVITE DES EFFETS

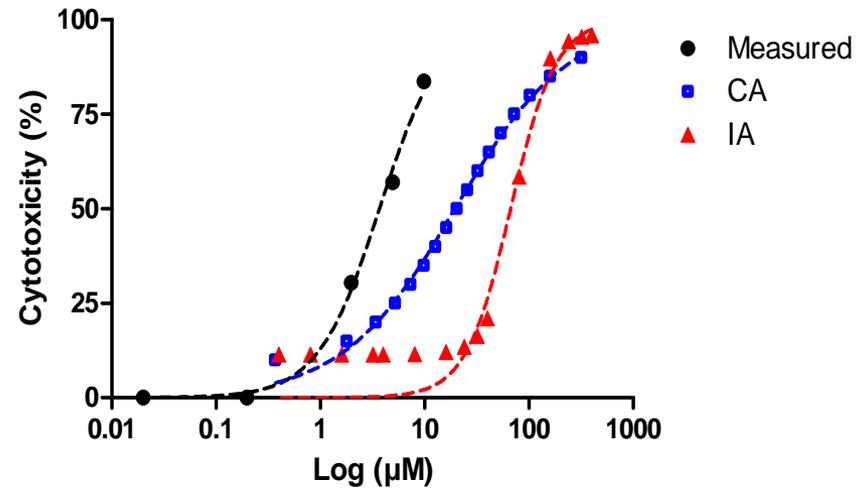


# Modélisation de la synergie d'action des contaminants

$CdCl_2+K_2TeO_3$  (2.72:1)

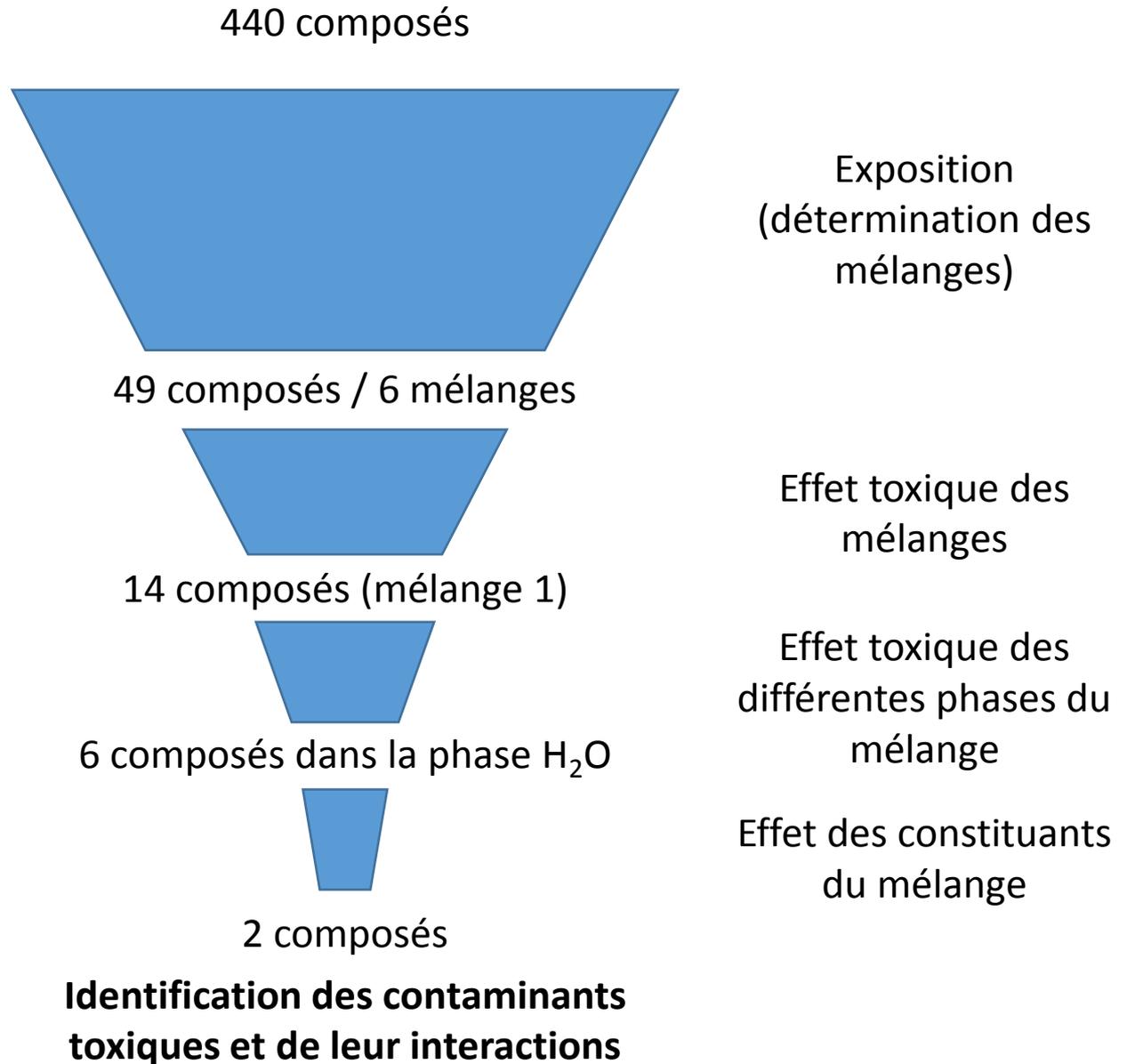


Mixture 1



**Confirmation mathématique des interactions synergiques des métaux.**

# Stratégie mise en place



# Conclusions & perspectives

## Déjà fait:

- Identification de deux mélanges de contaminants génotoxiques et mutagènes.
- Observation d'une synergie des effets toxiques entre les constituants des mélanges.

## Mais reste à faire...

- Détermination des mécanismes d'action synergiques des composés.
- Effets chroniques des mélanges. (Voir Poster B. Kopp)
- Déterminer les effets des nouveaux mélanges en prenant en compte les données les plus à jour de consommation et de contamination.
- Autres toxicités (PE, immuno, repro...).

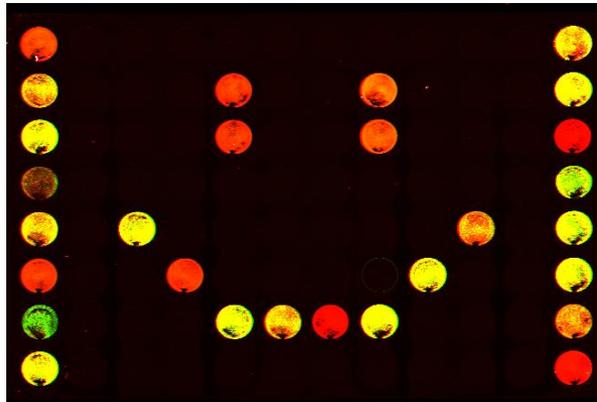
# Merci pour votre attention

[marc.audebert@inra.fr](mailto:marc.audebert@inra.fr)

**B. Kopp**



D. Zalko  
I. Alassane-Kpembé



L. Le Hégarat  
V. Fessard  
A. Crépet  
E. Traoré



[www.preditox.fr](http://www.preditox.fr)