
NOUVELLES APPROCHES EN TOXICOLOGIE PRÉDICTIVE POUR L'ÉTUDE DE LA TOXICITÉ DES MÉLANGES DE CONTAMINANTS PRÉSENTS DANS L'ALIMENTATION FRANÇAISE

Thèse de Benjamin **KOPP**¹

Analyse de Dominique **PARENT-MASSIN**²

Directeur de thèse : Marc **AUDEBERT** Directeur de recherche INRAE

Co-directeur de thèse : Ludovic **Le HÉGARAT** Chef d'unité adjoint Toxicologie des contaminants de l'Anses

La question de la toxicité des mélanges de substances chimiques fait partie de sujets régulièrement évoqués par les ONG et les médias. Cependant, mettre en œuvre des études toxicologiques classiques sur des animaux de laboratoire pour caractériser le danger et évaluer les risques des mélanges nécessiterait l'utilisation de très nombreux animaux, au vu des très nombreuses combinaisons possibles de cocktails. Les toxicologues sont donc à la recherche de méthodologies permettant de caractériser les dangers des mélanges en respectant la règle des 3R. Le titre de cette thèse est un peu trompeur car ce travail se limite principalement aux effets génotoxiques des mélanges. Cependant la détection des effets génotoxiques est une étape essentielle dans la caractérisation des dangers puisqu'elle permet de détecter des substances potentiellement capables d'induire des lésions à ADN, première étape de la cancérogenèse. Cet effet dit génotoxique étant considéré comme sans seuil, toute substance soumise à autorisation qui présenterait un test positif ne sera jamais autorisée.

Le manuscrit de thèse de Benjamin Kopp commence par une remarquable synthèse bibliographique sur la question posée et plus particulièrement sur l'état des connaissances en génotoxicité et l'état de l'art dans les tests de détection des effets génotoxiques, dont les plus innovants. Après avoir présenté les lignées cellulaires qui seront utilisées, la méthodologie utilisée pour identifier les principaux mélanges retrouvés dans l'alimentation française est décrite.

Le travail expérimental se divise en 3 parties :

1. **Étude la génotoxicité et la cytotoxicité *in vitro*** de 49 contaminants alimentaires seuls et des six mélanges de contaminants issus de six régimes alimentaires différents identifiés par l'Anses, en utilisant un test de génotoxicité *in vitro* (γ H2AX ICW) prédictif des effets génotoxiques et cancérogènes des substances *in vivo*. Quand certains mélanges étaient génotoxiques, leurs potentiels effets mutagénèses ont été

¹ Thèse en vue de l'obtention du Doctorat de l'Université de TOULOUSE 3 – Paul Sabatier, Ecole doctorale SEVAB - Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingenieries, spécialité Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition, Unité mixte de recherche TOXALIM 1331 - Laboratoire de Toxicologie Alimentaire INRAE, présentée et soutenue le 12 octobre 2018

² Membre de l'Académie d'agriculture de France, vice-secrétaire de l'Académie, section 8 « Alimentation humaine »

caractérisés grâce à un nouveau test de mutagenèse Pig-a *in vitro* en développement dans le laboratoire où la thèse a été réalisé (Anses Fougères), ainsi que le potentiel carcinogène avec un test de transformation cellulaire. La génotoxicité des mélanges sur des périodes plus longues, pouvant aller jusqu'à sept jours, a été également étudié sur les cellules de la lignée HepaRG, connu pour leurs capacités de métabolisation.

2. **Identification des potentiels effets « mélanges »** des contaminants *in vitro* en comparant les réponses cytotoxiques des composés seuls et en mélange observées expérimentalement à des modèles mathématiques (CA, IA et isobogramme CI). Les effets concentrations réponses des différents mélanges de contaminants ont été comparés à ceux des molécules seules, afin de déterminer s'il existait une additivité, un antagonisme, ou une potentialisation, entre les composés présents dans les mélanges. Ces éventuels effets mélanges ont ensuite été confirmés avec des modèles mathématiques (CA, IA, hybride CA-IA, isobogramme).
3. **Identification des mécanismes** impliqués dans les effets mélanges grâce à une plateforme d'imagerie cellulaire permettant une analyse multiparamétrique de marqueurs de cytotoxicité. Une fois la génotoxicité du mélange démontré, il s'agissait, suivant une approche réduite, de déterminer quel(s) composé(s) est responsable de l'effet du mélange. Grâce à une plateforme d'imagerie cellulaire à haut contenu informatif (HCA), il a été possible d'évaluer en simultanément plusieurs marqueurs en toxicologie couvrant une palette d'évènements cellulaires variés permettant de comprendre les mécanismes impliqués.

Ce travail a donné lieu à trois articles présentés dans le document.

L'étude a montré que deux mélanges parmi les six étaient génotoxiques et mutagènes, à des concentrations où les composés pris individuellement n'ont aucun effet, suggérant un effet combiné non additif. Le premier mélange concerné est associé à un cluster dit « simple » qui représente 18 % de la population totale. Le régime est la combinaison de produits alimentaires simples non transformés comme du pain, des pâtes, de la viande, du beurre, du fromage, du yaourt, du café, du sucre, des œufs, de l'huile, des produits végétaux et des pommes de terre. Le mélange se caractérise par la présence de mycotoxines (HT-2, déoxynivalenol, zéaralénone et nivalénol, de HAP (pyrène et phénanthrène) et de bisphénol A mais également de métaux lourds comme le cadmium, le nickel, le tellure, et du plomb. Le second régime s'avérant génotoxique représente 8% de la population, et comprend surtout des femmes âgées (62 %). Ce régime est dit « végétal » avec une alimentation essentiellement composée de fruits et de légumes, ainsi que de la vinaigrette, de la glace à la crème et des œufs et donc largement composé de pesticides (11/19 contaminants du mélange), mais également de BPA et de métaux lourds comme le nickel, le vanadium, l'arsenic inorganique, le plomb, le germanium. D'un point de vue proportion, le vanadium (Vd) (26,5 %) et le Ni (60,8 %) sont les contaminants majoritaires du mélange. Ces effets sont dus à deux métaux lourds dont les effets sont synergiques, cadmium et tellure dans le premier cas, et cadmium et arsenic inorganique dans le second.

L'intérêt principal de ce travail pour l'Académie d'agriculture et plus particulièrement la section alimentation humaine, est d'une part la méthodologie suivie, d'autre part, l'identification des composés responsables de ces effets toxiques.

En conséquence, les résultats de ces travaux méritent que cette analyse figure sur le site de l'Académie à titre de valorisation.