



Projet Euromix. Vers une démarche normalisée, à l'échelle européenne, pour évaluer les risques des mélanges de contaminants chimiques.

Georges de Sousa, Nathalie Zucchini-Pascal, Gaëlle Hichard, Marine Tutoy, Patrick Rouimi, Roger Rahmani

► To cite this version:

Georges de Sousa, Nathalie Zucchini-Pascal, Gaëlle Hichard, Marine Tutoy, Patrick Rouimi, et al.. Projet Euromix. Vers une démarche normalisée, à l'échelle européenne, pour évaluer les risques des mélanges de contaminants chimiques.. Innovations Agronomiques, 2019, 73, pp.61-73. 10.15454/OZ3SPV . hal-02282234

HAL Id: hal-02282234

<https://hal.science/hal-02282234>

Submitted on 3 May 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

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 EuroMix¹ 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 : Euromix project. Towards a standardised European approach for assessing the risks of chemical contaminant mixtures

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, constituants des plastiques 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, médicaments, travail, etc ...). 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, 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 (relation dose /réponse) 3/ évaluation de l'exposition, 4/ caractérisation du risque. Sachant que les mélanges sont rarement constitués de composés ayant strictement un mode d'action - MOA similaire ou dissimilaire, comment estimer les 3 types d'interactions possibles : i/ addition des doses ou des concentrations, ii/ indépendance d'action, iii/ interaction entre les composés (Kortenkamp et al., 2009).

C'est un enjeu sociétal reconnu au niveau du programme européen H2020, qui finance plusieurs contrats de recherche contribuant à l'évaluation des risques liés aux mélanges (EDC-MixRisk², EuroMix, HBM4EU³, SOLUTIONS, EUTOXRISK⁴) (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 financé par l'INCA, MEPIMEX financé par l'ONEMA (Kadar et al., 2017) et MYCOTOX, soutenu par l'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 (AOP⁵ ; voir article de J.P. Cravedi, ce numéro) » 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 (QSAR⁶) et l'amarrage moléculaire (docking), le concept de seuil de risque toxicologique (TTC⁷) 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 AOP. Des essais *in vitro* utilisant les chemins de l'effet adverse sont effectués pour mesurer la puissance des produits chimiques. Sur la base des 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

² <http://edcmixrisk.ki.se/>

³ <https://www.hbm4eu.eu/>

⁴ <http://www.eu-toxrisk.eu/>

⁵ AOP : Adverse outcome pathway ;

⁶ QSAR : Quantitative structure–activity relationship

⁷ TTC : Threshold of toxicological concern

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-TK⁸ (ou IVIVE⁹) 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 (CAG10) sur la base des AOP testés, 2) l'utilisation de données *in-silico* et *in-vitro* dans l'évaluation des risques liés aux mélanges (MRA11), 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 (MOE12) conformément à une évaluation par paliers telle que décrite dans les lignes directrices internationales¹³. Des études de cas pour l'évaluation combinée et agrégée de l'exposition à l'aide de cette boîte à outils ont été réalisées.

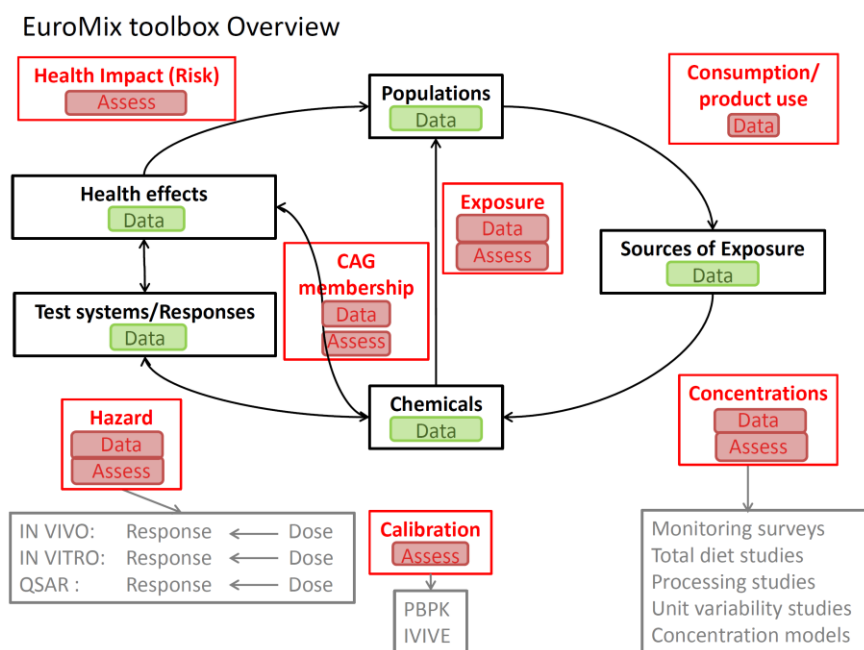


Figure 1 : Représentation simplifiée de la ToolBox Euromix

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 pyréthrinoides. 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

⁸ PB-TK : Physiologically-based toxicokinetic

⁹ IVIVE : *In vitro* to *in vivo* extrapolation

¹⁰ CAG : Cumulative assesment group

¹¹ MRA : Mixture risk assessment

¹² MOE : Margin of exposure

¹³ <https://www.efsa.europa.eu/fr/topics/topic/margin-exposure>

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, aux workshops organisés dans le cadre du projet Euromix, d'experts clés 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 « documents guides » 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 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 (Figure 2) 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).

Le projet Euromix a tout d'abord identifié parmi les pesticides, les additifs, mycotoxines et autres produits chimiques une liste de substances susceptibles d'être véhiculées par notre alimentation. Il a ensuite catégorisé ces molécules en termes de CAG (entrant dans l'AOP stéatose hépatique) sur la base de données toxicologiques issues de la littérature (data mining) et de modèles *in silico*. Ces données ont été croisées avec les données d'exposition afin d'identifier les mélanges (agrégés et combinés) d'intérêt pour l'AOP stéatose (mais également pour les deux autres AOP : distance anogénitale et la malformation cranio-faciale) (Figure 3).

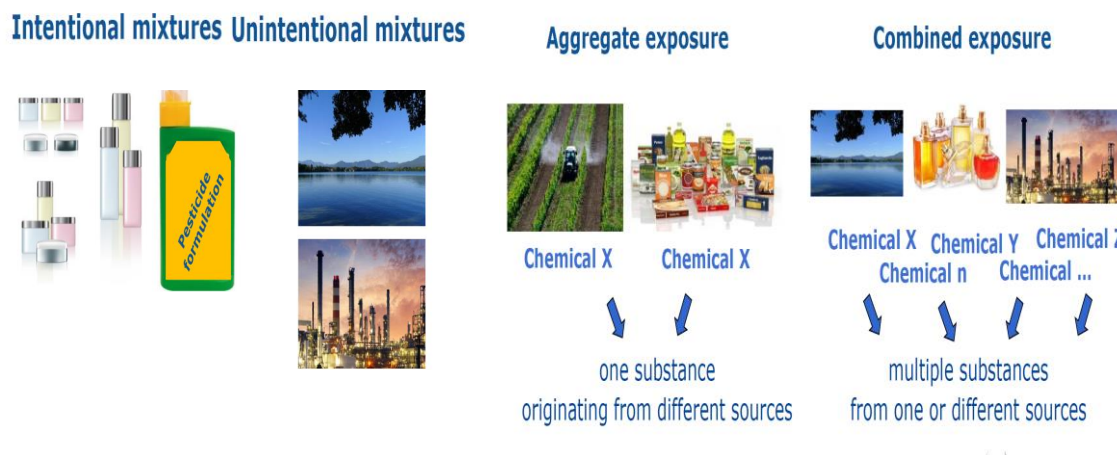


Figure 2 : Voies d'exposition de la population.

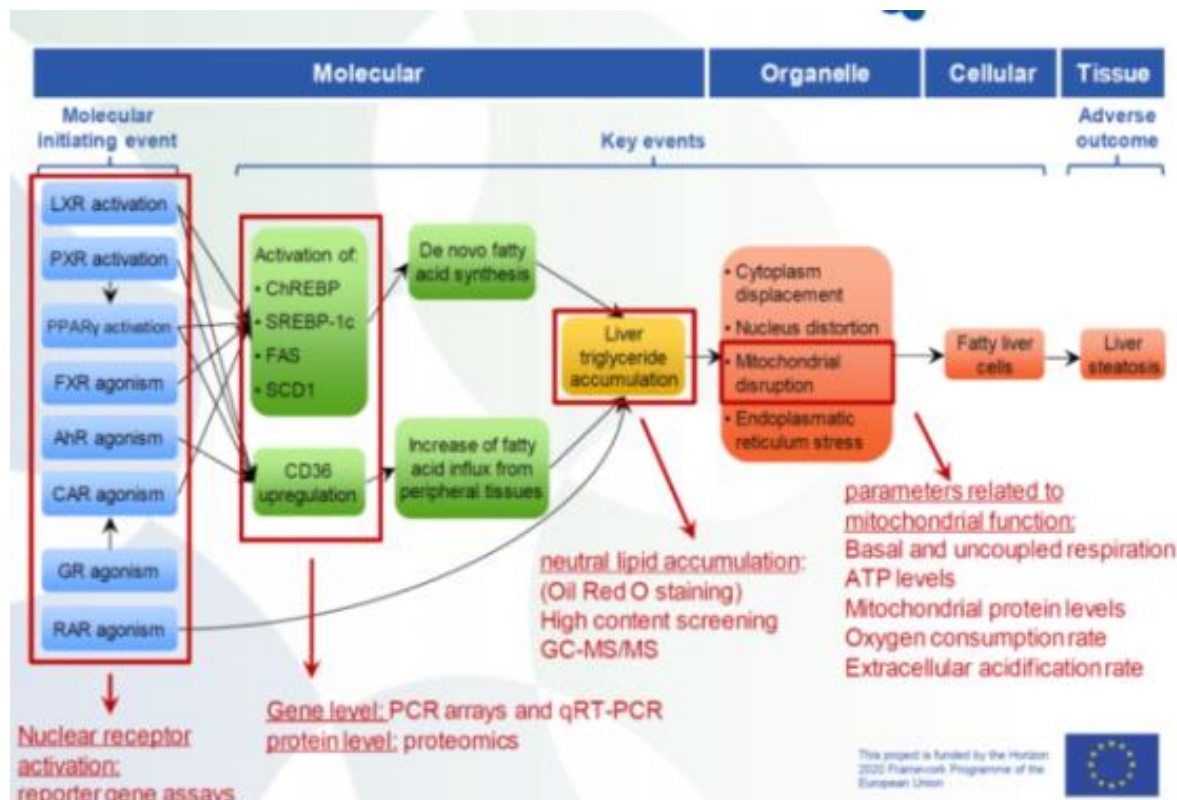


Figure 3 : Chemin de l'effet averse pour l'apparition de la stéatose hépatique. Les paramètres qui sont étudiés sont indiqués en rouge.

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

L'équipe Toxicologie Cellulaire et Moléculaire des Xénobiotiques s'est appliquée 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>).

Cette même équipe a participé au développement de modèles PB/PK en étudiant 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 4)

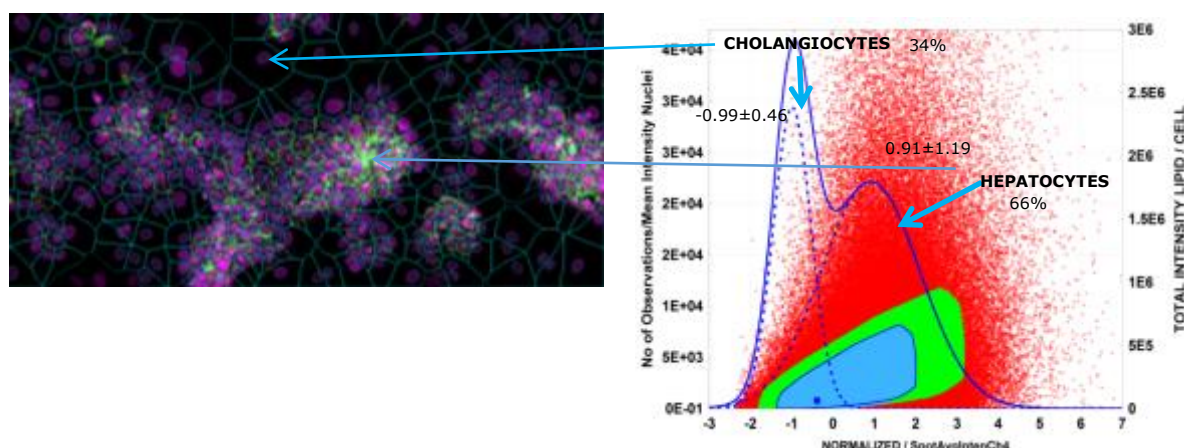


Figure 4 : Les cellules HepaRG accumulent des gouttelettes lipidiques (traitement cyclosporine : contrôle positif). Après avoir délimité les surfaces cellulaires, les intensités nucléaires (fuchsia) et les intensités des gouttelettes lipidiques (vert) dans chaque cellule sont quantifiées. L'intensité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

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), qui 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.

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

Dans un premier temps nous avons validé notre approche cellulaire sur une molécule modèle : le cyproconazole testé en fonction de la dose et du temps d'exposition (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 selon leur puissance relative « 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).

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 (MOA) et des chemins de l'effet adverse (AOP) et de la modélisation ont été appliqués à l'apparition de la stéatose hépatique

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.

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)	Cyclosporin A
	Thiacloprid (PXR,PPAR)	Clothianidin
	Fenpyroxymat (PXR)	

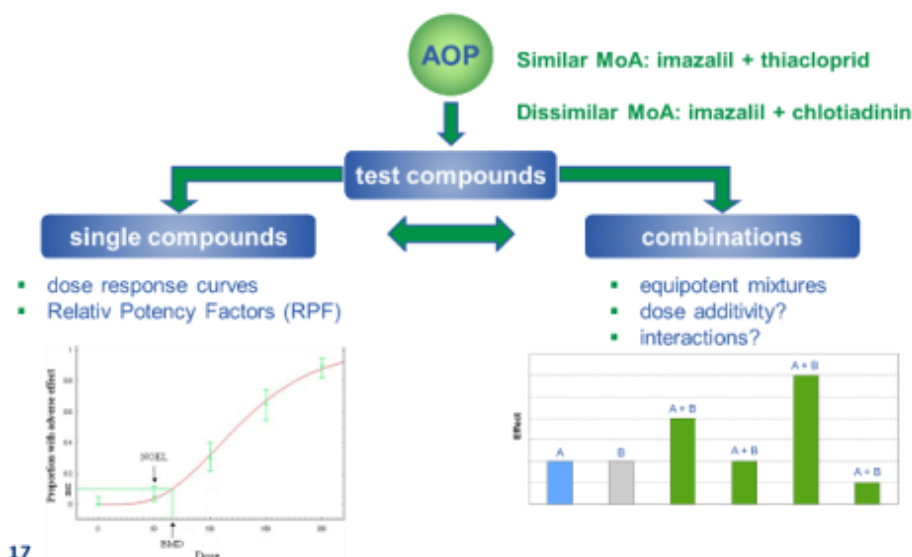


Figure 5 : Concept du test : les doses réponses de chaque molécule permet de calculer les RPF. Les mélanges sont créés sur la base de puissance équivalente. La modélisation de l'effet mélange est effectué selon le modèle de dose addition.

5. Quelques résultats marquants

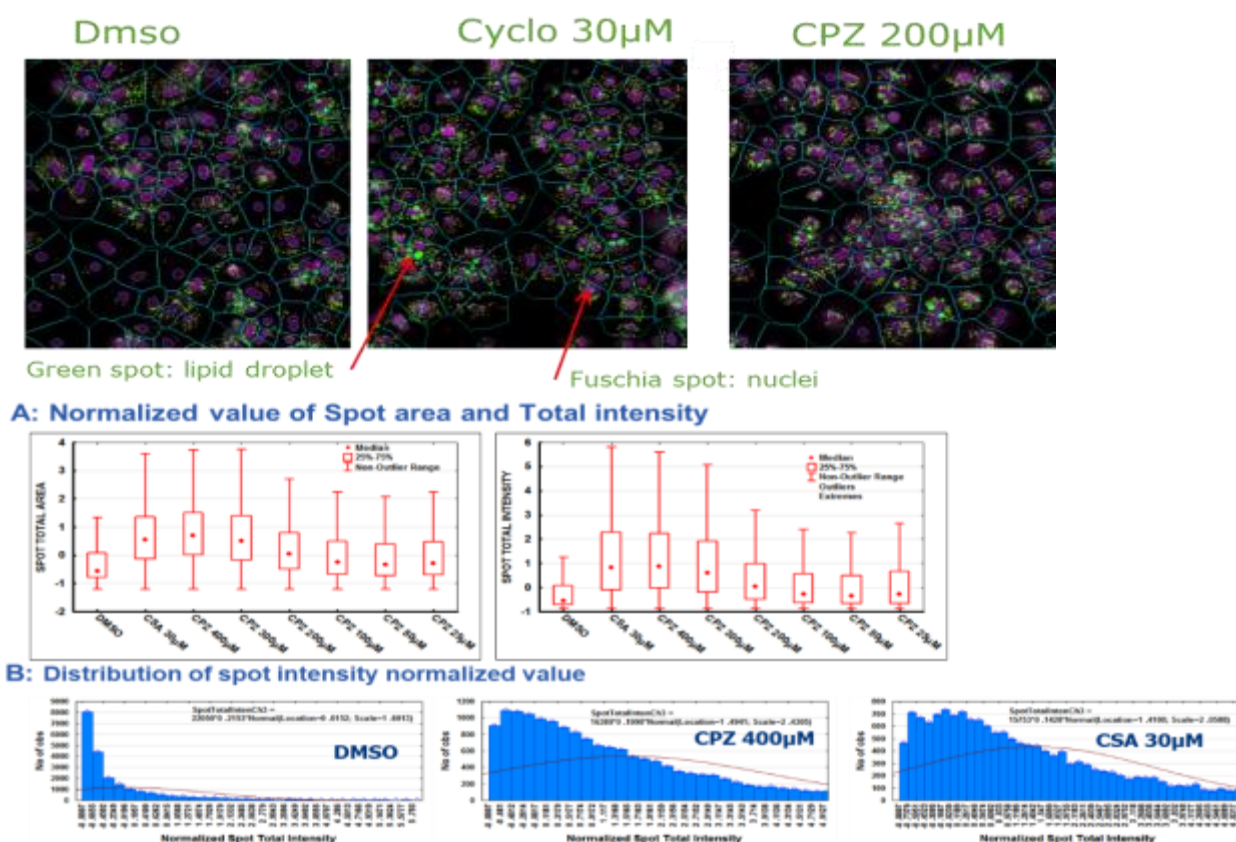
5.1 Mélange et stéatose hépatique

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 boîte à outils 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 de gouttelettes lipidiques. 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 pour valider l'ensemble l'extrapolation *in vitro/in vivo* de nos résultats (ToolBox Euromix).

L'effet du cyproconazole sur l'accumulation de lipides dans les HepaRG étant publié, démontrant la validité du modèle, des résultats plus récents sur hépatocytes humains sont présentés (Figure 6) 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.



C : Niveau d'induction par rapport au contrôle

		CSA	CPZ (µM)						
	DMSO	30	400	300	200	100	50	25	
SPOT TOTAL INTENSITY	1.0	7.9	8.2	6.6	3.8	2.4	2.1	3.2	
SPOT TOTAL AREA	1.0	4.4	4.8	4.3	2.9	2.1	1.8	2.3	

Figure 6 : Le cyproconazole induit une accumulation de lipides dans les hépatocytes humains cryoconservés (3 foies indépendants). Les hépatocytes humains ont étéensemencés dans 96 plaques multipuits. Après 24 heures, les cellules ont été exposées à 0,5 % de DMSO (contrôle : solvant) , CSA (cyclosporine contrôle positif) et CPZ (cyproconazole, 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 classer l'ensemble des molécules selon leurs effets phénotypiques.

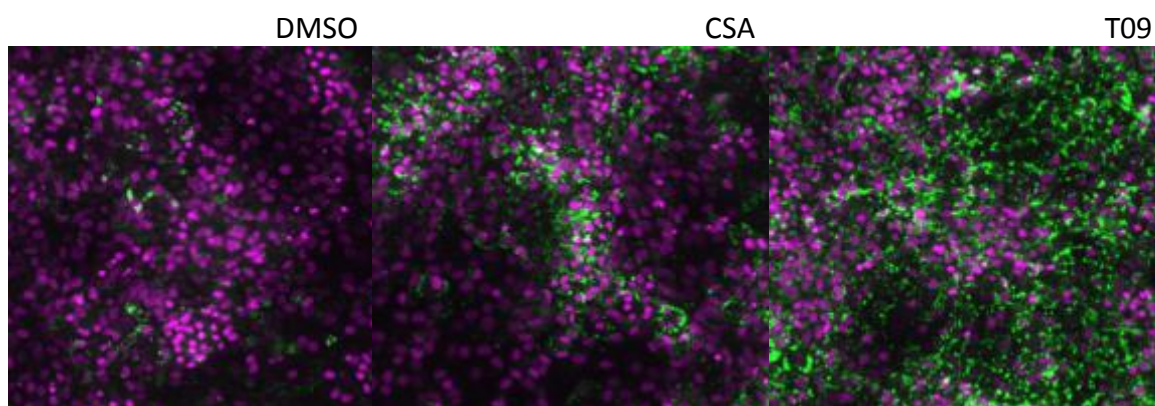


Figure 7 : Microphotographie de cellules HepaRG après 72 heures d'exposition à la CSA et T09 (contrôle DmsO)

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, une réduction des données produites par l'analyse à haut contenu a été nécessaire préalablement à l'utilisation du « Benchmark Dose modelling software PROAST » et analyser ainsi 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.

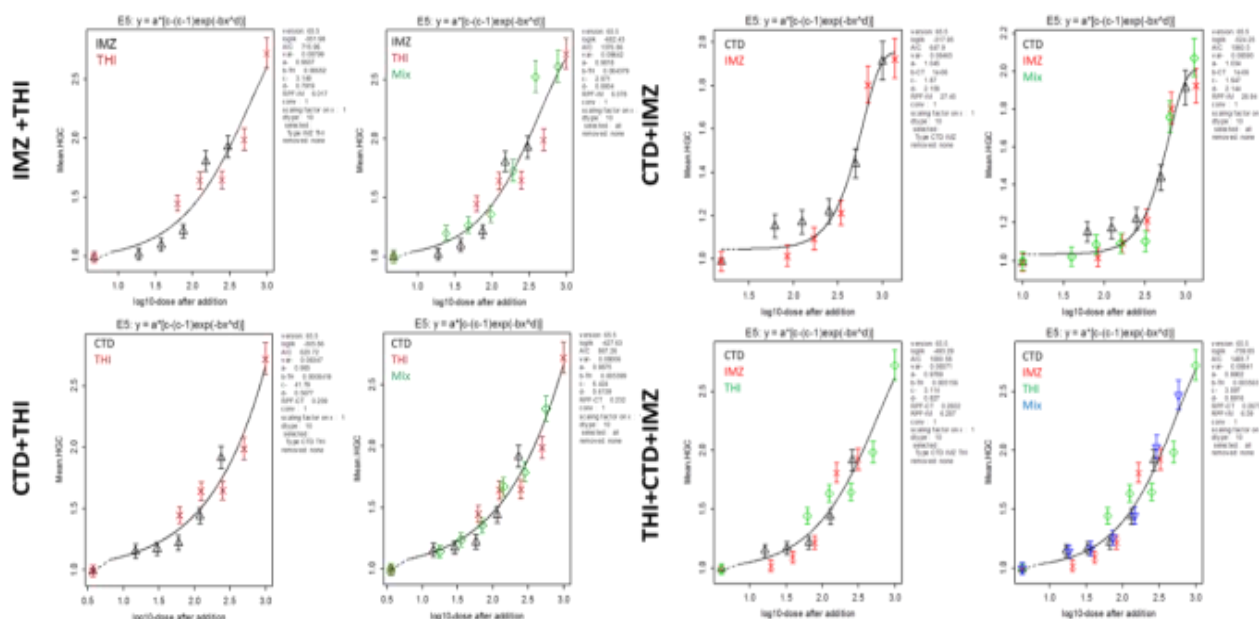


Figure 8 : Application du modèle de concentration addition : pour les combinaisons binaires la courbe noire, représente la courbe théorique de l'effet mélange obtenue (modélisée) à partir des données de chaque molécule. Celle-ci corrèle parfaitement avec les points expérimentaux (vert) obtenus en traitant 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 (prises individuellement) car pour certaines il y a un vrai manque d'information sur leur mode d'action.

Il existe au niveau européen (et plus largement mondial) un manque d'harmonisation que les programmes EuroMix (Rotter et al., 2019) et Mixtox¹⁴ 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 de recherche, industriels et instances réglementaires 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).

Partenaires du projet EuroMix



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.

¹⁴ <https://www.efsa.europa.eu/en/consultations/call/180626-0>

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](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.

Rotter S. et al., 2019. "Overview on Legislation and Scientific Approaches for Risk Assessment of Combined Exposure to Multiple Chemicals: The Potential EuroMix Contribution." Critical Reviews in Toxicology 0(0): 1–19. <https://doi.org/10.1080/10408444.2018.1541964>.

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

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 ou DOI).