



HAL
open science

Effets "cocktails" des contaminants alimentaires : Problématique des résidus de pesticides dans l'alimentation

Patrick Rouimi

► **To cite this version:**

Patrick Rouimi. Effets "cocktails" des contaminants alimentaires : Problématique des résidus de pesticides dans l'alimentation. 57èmes Journées Nationales de Diététique et de Nutrition - Marseille, 2-4 mai 2016, May 2016, Marseille, France. hal-03776070

HAL Id: hal-03776070

<https://hal.science/hal-03776070>

Submitted on 13 Sep 2022

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.

Effets "cocktails" des contaminants alimentaires : Problématique des résidus de pesticides dans l'alimentation.

Patrick ROUIMI

TOXALIM, Université de Toulouse, INRA, INP-ENVT, INP-EI-Purpan, Université de Toulouse 3 Paul Sabatier, Toulouse, France

Equipe INRA - TCMX (*Toxicologie Cellulaire et Moléculaire des Xénobiotiques, Roger Rahmani*)

Résumé

La compréhension de l'impact pharmaco-toxicologique des substances chimiques issues de l'activité humaine, et plus particulièrement des techniques agricoles, représente un enjeu majeur de la toxicologie alimentaire, et de la toxicologie environnementale au sens large, notamment raisonnées en termes d'expositions multiples, à des faibles doses et de façon chronique.

Les pesticides sont un bon exemple de substances répondant à ces critères. En effet, ils sont représentés dans pratiquement toutes les denrées alimentaires sous forme de "cocktails" d'une grande variété de familles de molécules, dépendants des usages agronomiques présents et passés.

Essentiellement pour des raisons techniques, les seuils toxicologiques définis par les autorités de régulation sanitaires, établis à partir d'exposition aux substances chimiques prises individuellement, sont encore difficilement extrapolable à la réalité des expositions humaines à des mélanges de xénobiotiques. En effet, des expositions régulières, simultanées ou successives à plusieurs substances peuvent induire des toxicités additives ou cumulatives, infra-additives (antagonistes) ou supra-additives (synergiques). D'où la nécessité de développer une recherche plus globale axée sur l'étude des perturbations physiologiques, cellulaires et moléculaires engendrées par l'exposition humaine aux mélanges, mais également des outils de modélisation. Ces approches combinées devraient permettre une meilleure compréhension des mécanismes impliqués et par conséquent d'espérer une amélioration de la prévention de l'impact des expositions multiples sur la santé humaine.

La contamination de notre alimentation : Etat des lieux

Sur la base des demandes d'enregistrement et d'évaluation liées à la directive Européenne REACH (1) on estime à environ 30 000 les substances destinées à un usage industriel en France, dont 1000 substances actives homologuées réparties en 150 familles chimiques différentes, uniquement pour les pesticides (source ORP : *Observatoire des Résidus de Pesticides*). Nos aliments sont issus de la production de denrées végétales, animales ou microbiennes subissant le plus souvent des transformations industrielles, des procédés de conservation, d'emballage et de distribution. On y compte des additifs, des conservateurs, des médicaments vétérinaires, des produits

phytopharmaceutiques et divers biocides qui se retrouvent en quantités résiduelles dans nos assiettes, sous la forme de molécule mère ou bien de dérivés issus de diverses transformations d'ordre physico-chimique (oxydation, cuisson,..), voire enzymatique exogènes (issus des procédés industriels) ou endogènes (métabolites). Pour exemple, un rapport de l'EFSA en 2013 (2) portant sur la recherche dans 29 pays de 685 pesticides dans 80 967 échantillons de produits alimentaires transformés et non transformés, a montré que de 97 % des aliments testés contenaient des résidus de pesticides. Ces contaminants ne dépassaient cependant les limites légales que pour 1.5 % d'entre-elles, avec une plus forte proportion (5,7 %) dans les produits importés de pays hors UE. Il est vraisemblable que l'amélioration constante dans les pratiques liées à la production alimentaire ces dernières années ait permis de progresser dans la qualité des aliments en matière de contamination. Cependant, l'alimentation et l'eau, bien que majoritairement impliquées, ne sont pas les seules voies d'exposition aux xénobiotiques. S'ajoutent aux sources alimentaires de l'homme, principalement des contaminants issus des pollutions de l'environnement (sols, air) ou du milieu de vie par des produits ménagers ou des biocides (habitations, bureaux, jardins), des traitements thérapeutiques (médicaments) ou de l'utilisation de cosmétiques. Toutes ces substances sont donc caractérisées par leur grande diversité d'origine, de propriétés physico-chimiques et sont présentes à des quantités souvent très faibles. Par conséquent, à court terme et/ou au cours de sa vie, un individu peut être exposé à une variété de substances de façon ponctuelle ou répétée.

Concrètement, les substances qui présentent le plus de risque estimé par les instances de veille sanitaire sont régulièrement signalées et font l'objet d'examens plus poussés. Ainsi, l'Efsa (Agence Européenne) et l'ANSES (Agence Nationale) ont publié conjointement en 2014 une liste des molécules présentant des risques potentiels les plus importants rapportés à l'ensemble de l'Europe (dieldrine et heptachlore) et localisés à la France (diméthoate, lindane, carbofuran, imazalil, dithiocarbamates, fipronil et nicotine), respectivement.

Evaluation d'un risque tolérable pour le consommateur

L'évaluation d'un risque "acceptable" d'exposition du consommateur suit des procédures entérinées par les autorités sanitaires (Gouvernements, UE) et épaulées par les instances de veille sanitaire (France : ANSES = fusion AFSSA+ AFSSET depuis le 1er Juillet 2010 ; Europe : Efsa ; USA : FDA, EPA ; Monde : OMS) qui ont pour la plupart un rôle consultatif (ANSES, Efsa). Pour chaque nouveau composé mis sur le marché, une évaluation préalable de sa toxicité est réalisée par ces instances au travers d'un dossier d'homologation (Autorisation de Mise sur le Marché ; AMM). Ces enquêtes se réfèrent à des études in vitro, des méta-analyses bibliographiques et des expérimentations sur animaux, et prennent en compte les voies d'exposition (alimentaire, aérienne, cutanée). Les risques liés à ces substances sont réévalués régulièrement (tous les 10 ans à priori), ainsi que les AMM lorsque c'est nécessaire. Des normes légales sont ensuite établies par les gouvernements. Elles incluent notamment les limites maximales de résidus tolérables dans les aliments (LMR) et des doses journalières d'exposition acceptables pour l'homme (DJA) ou estimée sur la vie entière (DJT). En parallèle, des campagnes de surveillance des pollutions environnementales (rejets chimique, polluants organiques persistants ou POPs, métaux lourds, toxines, etc...) sont assurées régulièrement afin de fournir des recommandations pour prévenir l'impact de l'environnement sur l'exposition humaine au travers notamment de la contamination des denrées alimentaires. Notons que ces évaluations peuvent parfois être limitées par des problèmes de faisabilité dus au coût ou au

développement analytique du moment. Un facteur sociétal, dû à la perception du consommateur de ces problématiques, peut également avoir un impact sur les prises de positions des décideurs (importance de la communication).

Impact des expositions aux contaminants alimentaires sur la santé de l'homme

Pour évaluer l'exposition, il faut tenir compte non seulement des substances autorisées présentes sous forme résiduelle dans notre environnement, mais également de celles qui sont interdites mais rémanentes en raison d'une forte persistance dans le milieu naturel, comme le DDT, le Lindane, la Chlordecone ou l'Atrazine, ainsi que de possibles molécules utilisées illégalement.

Une expertise collective très complète réalisée par l'INSERM en juin 2013 avec l'aide de plusieurs experts nationaux et européens (3), détaille les connaissances actuelles au niveau international concernant l'impact des pesticides sur la santé humaine. Elle regroupe des données expérimentales d'épidémiologie, de toxicologie et de mesure d'exposition, tant au niveau professionnel (expositions aiguës) qu'au niveau de la population générale (expositions répétées ou chroniques).

Les pathologies présumées induites par des expositions aux pesticides sont pour l'essentiel : des cancers, des atteintes neurologiques et neuro-dégénératives, et des perturbations du développement et de la fertilité. Des présomptions fortes sont établies, pour certaines substances interdites, entre la survenue de lymphomes non hodgkiniens (LNH) ou leucémies et l'exposition au Lindane, de leucémies et Alachlore, ou encore de maladie de Parkinson après exposition à la Rotenone ou au Paraquat. Des présomptions moins fortes mais probables sont révélées entre Lindane, Malathion, Atrazine et LNH, ou entre Permethrine, Clordecone et cancer de la prostate. Concernant les pesticides autorisés, des liens probables sont décrits entre l'exposition à plusieurs d'entre eux et la survenues de pathologies comme les leucémies (Mancozèbe/Manèbe , Chlorpyrifos), les LNH (Chlorpyrifos, Glyphosate, 2,4-D , Mancozèbe/Manèbe) ou le développement neurologique de l'enfant (Chlorpyrifos). Des liens possibles avec la survenue de Parkinson (Mancozèbe/Manèbe + Paraquat), des LNH (Mecoprop et MCPA) ou certaines morts fœtales (Glyphosate) ont aussi été mis en évidence.

Problématique des mélanges : comment aborder l'étude des effets "cocktail" ?

Le terme de "cocktail" est souvent employé pour désigner un ensemble de plusieurs substances chimiques ou contaminants auxquels l'homme est exposé simultanément et qui peut induire des effets sur sa santé. Dans le rapport de l'Efsa sur la contamination des denrées alimentaires mentionné précédemment (2), il est révélé que 27.3 % des denrées contaminées par les résidus de pesticides l'étaient par plusieurs substances. La compréhension des effets potentiels liés à ces multi-expositions, représente un défi majeur en termes d'enjeux scientifiques et d'attentes sociétales pour la gestion des risques. La question principale qui se pose est : Ces substances, une fois combinées, peuvent-elles avoir un impact différent, et notamment plus toxique, que la somme des substances prises séparément ?

Bien que plus anciennes sur un plan historique, et pour diverses raisons techniques de faisabilité, ces préoccupations n'ont débouché que relativement récemment sur des actions d'évaluation toxicologique concrètes. Ainsi en 2013, l'Efsa a développé une méthode pour l'évaluation des risques

cumulés des pesticides. Puis en 2014 cette Agence a lancé ses premières évaluations de la toxicité cumulée des pesticides pour aboutir récemment au développement d'un nouvel outil informatique d'appui méthodologique à l'expertise collective, qui semble induire une avancée majeure dans les outils d'évaluation des risques cumulés (4).

On peut classer les effets toxiques potentiels des mélanges de contaminants en plusieurs catégories :
Effet additif ou cumulatifs : Somme des effets de chaque produit pris individuellement (aucune interaction directe).

Potentialisation : Accroissement de la dangerosité d'un produit toxique par une substance n'ayant habituellement pas d'effet toxique.

Effet supra-additif : L'effet produit par le mélange est plus important que celui produit par la somme des effets des constituants.

Effet infra-additif : L'effet produit par le mélange est moins important que celui produit par la somme des effets des constituants.

Depuis les années 2000, certaines évidences sont apparues dans l'étude des mélanges, comme le fait que certaines substances, même à des doses inférieures à la NOAEL (Non Observable Adverse Effects Level), et même si leur mécanisme d'action sont différent, peuvent induire l'apparition de marqueurs associés à des perturbations endocriniennes. De plus, il a été montré que les composés d'un mélange qui ont pour cible un même tissu peuvent exercer des effets additifs et/ou dépendants de la dose.

Une base importante de la réflexion récente sur la problématique des "cocktails" a été posée au travers d'une méta-analyse bibliographique réalisée par Pohl et al. en 2009 (5). Dans cette étude, 380 publications traitant des mélanges binaires publiées au cours des 15 années précédentes ont été analysées. 156 cas d'effets additifs, 76 cas d'effets supra-additifs (synergie) et 57 cas d'effets infra-additifs (antagonisme) ont été identifiés. Dans 91 cas, l'information n'était pas suffisante pour classer l'effet.

Lorsqu'on l'envisage à l'échelle réglementaire, on ne peut que constater l'impossibilité d'une solution simple à l'évaluation toxicologique des effets des mélanges, en raison des problèmes techniques de façon générale et des coûts, compte-tenu du nombre et de la variété physico-chimique considérable des contaminants environnementaux à tester. De fait, l'évaluation de l'impact des mélanges est encore actuellement largement étayée par des études réalisées sur chaque substance isolément suivi de combinaisons prédictives sur le principe de l'additivité. Seules les substances actives ayant le même mécanisme d'actions toxiques et issues d'une même classe chimique (triazoles, dioxines...), font l'objet d'une évaluation du risque cumulé.

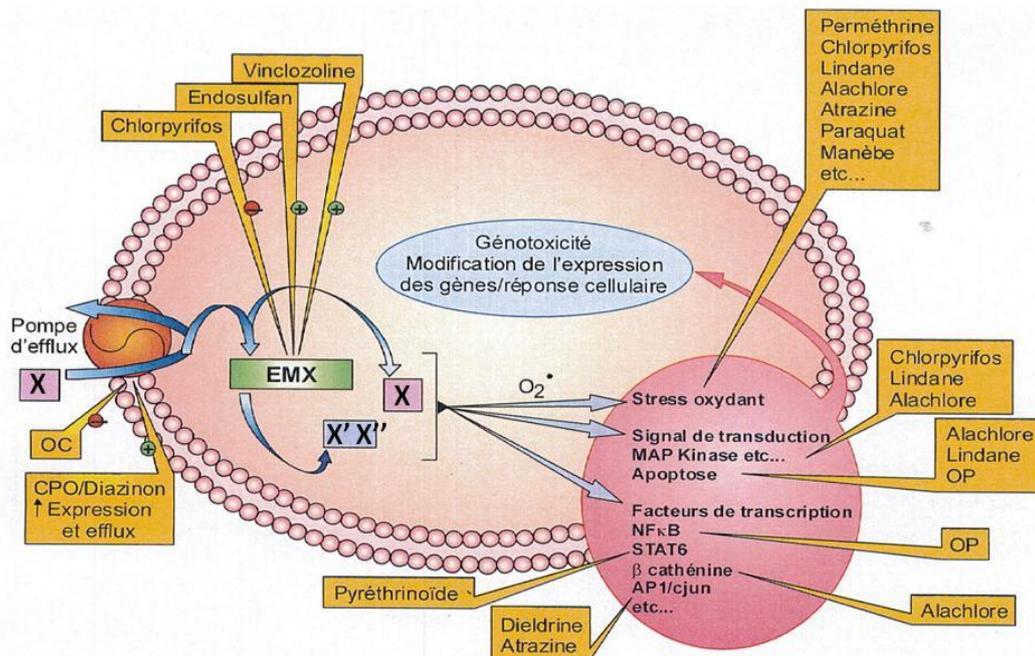


Figure 1 : Complexité de l'impact des pesticides sur la mécanistique cellulaire

Tiré du compte-rendu de l' Expertise collective de l'Inserm Pesticides Effets sur la santé - Chocques, 4 juin 2015

En raison du déficit de données expérimentales concernant l'effet des mélanges, il est nécessaire de modéliser leurs impacts pharmaco-toxicologiques potentiels à partir des données disponibles sur les substances testées isolément ou par groupes restreints (2 ou 3 substances). Incrémenter nos connaissances par des approches expérimentales et l'élaboration d'outils d'analyse et de prédiction de l'impact des mélanges est donc actuellement un challenge important. Toutes les pathologies qui découlent de l'exposition aux pesticides sont précédées d'un ensemble de perturbations dans l'homéostasie cellulaire en général. Compte tenu de la diversité et du nombre des substances chimiques auxquelles l'homme est exposé, et si l'on ajoute l'impact du métabolisme, tenter d'appréhender l'évaluation de l'effet des pesticides par le biais de la mécanistique cellulaire, bien que très complexe (Fig.1), est une des voies essentielle à développer en parallèle des approches globales (transcriptomique, métabolomique). La modélisation mathématique des réactions possibles est aussi une voie essentielle à explorer sur le plan de la prévention du risque.

Ces enjeux vastes et complexes nécessitent un investissement collaboratif au niveau national et international si l'on espère contribuer à de possibles évolutions vers une sécurité accrue des consommateurs face aux défis scientifiques de l'exposition aux mélanges de contaminants.

Apports de la recherche

Nous décrivons ici les résultats de quelques exemples d'études récentes liées à l'effet cocktail des xénobiotiques et réalisées par l'INRA et ses partenaires.

Le projet PERICLES soutenu par L'ANSES a abordé l'exposition réelle de la population française. Il a comporté 3 phases principales. En premier lieu, la mise au point d'une méthode statistique de classification appliquée à ces expositions afin de déterminer les principaux mélanges mais également d'identifier les aliments courants potentiellement vecteurs dans l'alimentation. Sept cocktails contenant de 2 à 6 pesticides ont ainsi été identifiés. Dans un deuxième temps, ces mélanges ont été utilisés pour réaliser une batterie de tests toxicologiques in vitro sur cellules humaines en culture représentatives de différents organes humains (foie, rein, intestin, cerveau, côlon). L'analyse de l'impact sur des paramètres cellulaires tels que la viabilité, la génotoxicité, l'activation de récepteurs hormonaux et la présence de biomarqueurs spécifiques, ont permis de cibler 3 cocktails les plus pertinents. Le modèle théorique d'additivité des doses et des réponses a été comparé aux résultats expérimentaux afin d'évaluer s'il était possible de prévoir l'effet d'un cocktail sur la base des connaissances des effets toxicologiques des pesticides seuls (6). Les résultats de cytotoxicité se sont avérés variables selon les cocktails et les lignées cellulaires. Les substances composant l'un des cocktails ont révélé un effet supra-additif et génotoxique sur la lignée hépatique humaine HepG2 (7). A contrario, des effets infra-additifs ont été mis en évidence dans les cellules de foie, via l'étude de la toxicité liée à de l'activation du récepteur PXR (8,9).

L'approche du projet EXPOMATPEST (Impact d'une exposition maternelle à un mélange de pesticides sur l'immunité, l'hématopoïèse et le système nerveux central de la descendance) soutenu par l'ANR et coordonné par L. Payraastre, a ciblé l'impact tissulaire et cellulaire d'une exposition alimentaire à 3 pesticides choisis (Chlorpyrifos, Endosulfan et Atrazine), seuls ou en mélange, in vivo chez la souris, en ciblant spécifiquement l'influence d'une exposition maternelle sur la descendance. Il s'est également appuyé sur une approche globale de métabolomique et une approche de mécanistique au niveau cellulaire au niveau du foie, organe clé du métabolisme. Sur le plan expérimental, les trois pesticides ont été incorporés à l'aliment seuls ou en mélanges et à faible dose (correspondant à la DJA), depuis l'accouplement jusqu'au sevrage des souriceaux. Ces derniers ont continué à recevoir l'aliment dont se nourrissaient leurs mères pendant une période additionnelle de 11 semaines. L'impact sur l'hématopoïèse, l'immunité, la fonction hépatique ou le système nerveux central a été évalué sur les organes prélevés à l'abattage. L'analyse métabolomique des plasmas d'adultes a permis de discriminer nettement les mâles et les femelles, mais également chaque groupe recevant un pesticide seul ou un mélange, indépendamment du sexe. Les perturbations métaboliques entre les différents groupes animaux étaient perceptibles dès le sevrage (10). L'analyse métabolomique des tissus en RMN à partir de souris exposées, in utero puis via l'aliment, à des faibles doses d'endosulfan, a confirmé un lien entre les paramètres modifiés au niveau hépatique (stress oxydant et à une atteinte du métabolisme du glucose) et les perturbations métaboliques au niveau plasmatique (11). Par ailleurs ces travaux, réalisés en collaboration avec une équipe INSERM du CHU Purpan, montrent qu'à des doses auxquelles ils sont supposés sans effet notable, l'atrazine, le chlorpyrifos, l'endosulfan, considérés individuellement, sont capables de perturber l'hématopoïèse, l'immunité ainsi que l'expression de certains gènes hépatiques liés au stress et à la toxicité cellulaire. Cependant, au niveau hématopoïétique le mélange n'exerce qu'un simple effet additif. En revanche, un effet neurotoxique supra-additif (plasticité synaptique diminuée) chez certains animaux de 14 semaines. Concernant l'expression des gènes de stress et de toxicité au niveau hépatique, le mélange a reproduit globalement les modulations induites par les pesticides seuls (8). L'étude mécanistique menée in vitro sur les des hépatocytes murins ou humains en culture

primaire a montré que les effets observés sur le mélange s'expliquent essentiellement par les effets du pesticide le plus actif (endosulfan ou chlorpyrifos, mais non atrazine selon les tests) (12).

L'ensemble de ces données met en lumière la difficulté de prédire la réponse des cocktails à partir des données obtenues sur les pesticides pris séparément.

La prise de conscience progressive par les autorités de sécurité sanitaire du besoin impératif d'inclure l'exposition aux mélanges dans l'évaluation du risque, s'est soldée notamment par le lancement en 2015 du projet EuroMix auquel notre équipe participe, dans le cadre du programme de recherche et innovation de l'U.E. "Horizon 2020". Le premier objectif de ce projet est de mettre en place une démarche normalisée pour classer les substances à risque en catégories sur la base de données d'exposition réelle et de définir leurs modes d'action vis-à-vis de leurs cibles toxicologiques. Le second est de développer une plateforme pilote de bio-essais pour évaluer leurs impacts sanitaires potentiels. De nouveaux outils communs de modélisation mathématiques seront élaborés pour le calcul du risque des mélanges sur la base des niveaux d'exposition déterminés. Au final, ce projet fédérateur au niveau Européen mais aussi potentiellement au niveau international (OMS, EPA), est censé favoriser le développement d'une stratégie, validée expérimentalement (études *in vivo* et *in vitro*), de regroupement et d'analyse de risque des mélanges de produits chimiques provenant de sources multiples (alimentation, air, sols..), et au cours des différentes étapes de la vie.

Conclusion

Pour des raisons techniques de faisabilité et de coûts, les méthodes d'évaluation des risques induits par l'exposition des populations aux mélanges de contaminants chimiques (en particulier les résidus de pesticides) qui ont été développées jusqu'à récemment ont reposé principalement sur le principe de l'additivité des doses.

La prise de conscience d'une nécessité d'affiner l'appréciation du risque a induit un renforcement des recherches destinées à renforcer l'appui aux décisions légales. Leur objectif est de:

- Mieux caractériser les mélanges auxquels le consommateur est exposé
- Approfondir les connaissances du mode d'action des constituants des mélanges
- Développer des outils de criblage à haut débit permettant la réalisation d'un grand nombre de tests (approches "omiques ") et le retraitement des données obtenues
- Créer des modèles mathématiques pour évaluer et anticiper le risque induit par des expositions multiples, intégrant les données toxicocinétiques liées à la biotransformation des différents constituants des mélanges

Références bibliographiques

- 1 -REACH - Règlement REACH : enregistrement, évaluation et autorisation des substances chimiques. Règlement CE n° 1907/2006
- 2 - The 2013 European Union report on pesticide residues in food (EFSA Journal 2015; 13(3):4038) et <http://www.efsa.europa.eu/fr/press/news/150312>
- 3 - Expertise collective de l'Inserm : Pesticides Effets sur la santé, 2013.
- 4 - Crépet A, Héraud F, Béchaux C, Gouze ME, Pierlot S, Fastier A, Leblanc JCh, Le Hégarat L, Takakura N, Fessard V, Tressou J, Maximilien R, de Sousa G, Nawaz A, Zucchini-Pascal N, Rahmani R, Audebert M, Graillot V, Cravedi JP. The PERICLES research program: an integrated approach to characterize the combined effects of mixtures of pesticide residues to which the French population is exposed. *Toxicology*. 2013, 313(2-3):83-93.
- 5 – Pohl HR, Mumtaz MM, Scinicariello F, Hansen H. Binary weight-of-evidence evaluations of chemical interactions--15 years of experience. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2009, 54(3):264-71.
- 6 - Mélanie Jacquet, Julien Jean, Carole Besret, Gilles Rivière. Évaluation des risques sanitaires liés à la présence de contaminants chimiques dans les aliments : retour d'expérience et proposition d'un outil méthodologique. *Environnement, Risques & Santé*, Volume 14, numéro 1, Janvier-Février 2015.
- 7 - Graillot V, Takakura N, Hegarat LL, Fessard V, Audebert M, Cravedi JP. Genotoxicity of pesticide mixtures present in the diet of the French population. *Environ Mol Mutagen* 2012, 53: 173-184
- 8- Rouimi P, Zucchini-PascalN, Dupont G, Razpotnik A, Fouché E, et coll. Impacts of low doses of pesticide mixtures on liver cells defense systems. *Toxicology in Vitro* 2012, 26: 718-726
- 9 - de Sousa G, Nawaz A, Cravedi JP, Rahmani R. A concentration addition model to assess activation of the pregnane X receptor (PXR) by pesticide mixtures found in the French diet. *Toxicol Sci*. 2014, 141(1):234-43.
- 10 - Demur C, Métais B, Canlet C, Tremblay-Franco M, Gautier R, Blas-Y-Estrada F, Sommer C, Gamet-Payrastre L. Dietary exposure to a low dose of pesticides alone or as a mixture: the biological metabolic fingerprint and impact on hematopoiesis. *Toxicology*. 2013, 308:74-87.
- 11 - Canlet C, Tremblay-Franco M, Gautier R, Molina J, Métais B, Blas-Y Estrada F, Gamet-Payrastre L. Specific metabolic fingerprint of a dietary exposure to a very low dose of endosulfan. *J Toxicol*. 2013, 2013:545802.
- 12 - Nawaz A, Razpotnik A, Rouimi P, de Sousa G, Cravedi JP, Rahmani R. Cellular impact of combinations of endosulfan, atrazine, and chlorpyrifos on human primary hepatocytes and HepaRG cells after short and chronic exposures. *Cell Biol Toxicol*. 2014, 30(1):17-29.