

MEPIMEX : Multi Exposition de l'homme aux Pesticides : évaluation des Interactions Métaboliques et Xéno-hormonales *in vitro*

Roger Rahmani

Mail : roger.rahmani@sophia.inra.fr



Vers une meilleure compréhension des effets « cocktails » ?

Responsables des équipes impliquées

- Rahmani Roger, de Sousa Georges, Kadar Ali, UMR 1331 TOXALIM 1331, Equipe de Toxicologie Cellulaire et Moléculaire des Xénobiotiques, INRA, Sophia Antipolis.

Mots clefs

Toxicologie *in vitro*, Biotransformation, Pesticides, Mélanges, Modélisation mathématique

Le projet MEPIMEX avait pour objectifs d'évaluer les impacts toxicologiques de mélanges de pesticides auxquels la population française est la plus exposée, via son alimentation. Plusieurs biomarqueurs d'effet ont été criblés *in vitro* : cytotoxicité, processus de détoxification, activation du récepteur nucléaire PXR humain. Parmi les 14 pesticides étudiés, 4 se sont avérés être de puissants agonistes du hPXR, 4 de moyenne et 6 de faible action. La plupart des mélanges activent fortement ce récepteur et induisent l'expression du gène cible CYP3A4. L'application d'un modèle mathématique de concentration-addition, montre, selon les cocktails de pesticides et leurs proportions, des effets additifs, supra- ou infra-additifs. Une étude métabolique a été menée sur un des mélanges (*éthion, linuron, chlorfenvinfos*) pour étudier les interactions entre les pesticides le composant (*K_m, V_m, clairance...*). Au total, des interactions métaboliques et toxicologiques entre les pesticides composant ces mélanges ont ainsi pu être démontrées, dont les incidences sanitaires restent encore à examiner.

Contexte et objectifs

Via leur environnement et en particulier leur alimentation, les consommateurs sont exposés de façon chronique à des résidus de pesticides. Selon leurs concentrations, leurs sites de bioaccumulation, leurs voies métaboliques, leurs cibles cellulaires et moléculaires... Ceux-ci peuvent donner lieu à des interactions pharmaco-toxicologiques, susceptibles d'engendrer des processus toxiques non prévisibles, voire néfastes (*perturbations hormonales...*). Des effets additifs, supra-additifs ou synergiques, infra-additifs ou antagonistes peuvent ainsi survenir. Le nombre considérable de xénobiotiques ajouté à leurs effets combinatoires rend l'évaluation toxicologique réglementaire des mélanges difficile à l'aide des méthodes traditionnelles. Cette complexité impose le recours à des approches expérimentales *in vitro* (*modèles cellulaires...*) et théoriques (*modélisation mathématique*). L'estimation pertinente des dangers et des risques sanitaires liés à ces cocktails de molécules impose donc une meilleure connaissance à la fois de leur mode

d'action et de leur biotransformation. Intégrées aux données d'exposition, épidémiologiques et obtenues chez l'animal, ces approches permettent d'optimiser la gestion des risques sanitaires. Les objectifs de ce projet étaient donc d'évaluer les potentielles interactions métaboliques et toxicologiques de pesticides en mélanges, auxquels la population française est exposée à travers son alimentation.

Méthodes

Les cocktails, composés de 2 à 6 pesticides, ont été sélectionnés parmi ceux identifiés par l'AFSSA dans le cadre du projet ANR Péricle. Les impacts toxicologiques de ces pesticides seuls et/ou associés ont ensuite été caractérisés *in vitro* (*hépatocytes, lignées d'hépatomes HepaRG et HepG2 parentale ou transfectée par le hPXR...*) au moyen de biomarqueurs cellulaires et moléculaires: cytotoxicité en temps réel par mesure d'impédance, transactivation du récepteur nucléaire hPXR et expression génique de ...

... certains gènes cibles. Les données obtenues et leur modélisation ont permis de hiérarchiser les différents produits et leurs mélanges, en termes d'effet biologique. Nous avons ensuite appliqué le modèle de concentration addition et estimé l'effet mélange en comparant les données expérimentales et théoriques (*modélisation des effets attendus*). Enfin, certaines molécules ont fait l'objet d'études métaboliques *in vitro*, nécessitant la mise en place de méthodes de dosage par GC-MS et LC-MS/MS spécifiques, afin de caractériser leurs paramètres cinétiques (K_m , V_m , clairance...), seules ou combinées.

Principaux résultats

Le modèle Bayésien développé par l'ANSES avait permis de sélectionner les 7 mélanges sur lesquels nous avons axé nos recherches.

Activation du PXR

Concernant l'activation du hPXR, les molécules prises séparément et les mélanges constitués ont été testés. Les courbes dose-réponse ont été modélisées par régression linéaire associée à des techniques de bootstrap (*Figure 1*).

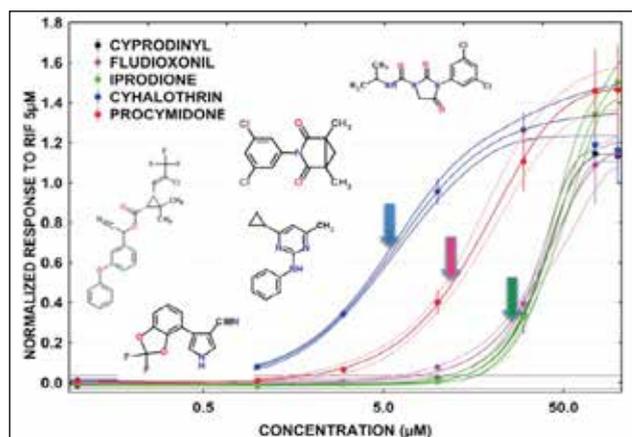


Figure 1 : Modélisation de l'activation du hPXR par les 5 pesticides du cocktail n°4

Les facteurs de transactivation des pesticides constitutifs des cocktails 2, 3 et 4, normalisés par rapport à la rifampicine (*agoniste modèle du hPXR* ; $EC_{50} : 1.8 \mu M$) sont consignés dans le Tableau 1. Une classification a pu ainsi être établie en termes de pouvoir agoniste vrai (V), modéré (M) ou faible (F) vis-à-vis du récepteur nucléaire hPXR, l'éthion s'avérant plus puissant que la rifampicine (x 1.98).

En termes d'effet « mélanges », tous s'avèrent significativement activer le hPXR de façon dose-dépendante. Les données expérimentales d'activation du PXR et théoriques (*utilisation d'un modèle mathématique de concentration addition, associé au bootstrap*) ont été ensuite comparées. Pour le mélange 2, constitué majoritairement d'agonistes vrais du PXR, l'effet cocktail s'avère très bien prédit par le modèle.

Pour les autres cocktails, nous avons en revanche noté des effets infra- ou supra-additifs, selon la proportion des pesticides (équimolaire vs réelle). Les différences observées

PESTICIDE			
$EC_{vs\ RIF,0.5} (\mu M)$	Effet vs RIF, groupe	$EC_{vs\ RIF,0.5} (\mu M)$	Effet vs RIF, groupe
Mélange 2		Mélange 3	
ETHION	0.91 1.98, V	TRIADIMENOL	2.55 0.071, V
CHLORFINVENFOS	2.4 0.75, V	PENCONAZOLE	9.40 0.19, M
LINURON	41.1 0.044, F	FENITROTHION	17.74 0.10, M
Mélange 4		FENHEXAMID	17.78 0.10, M
CYHALOTHRIN	4.2 0.43, V	QUINOXYFEN	45.83 0.022, F
PROCYMIDONE	12.2 0.15, M	PYREMETHANIL	189 NA
FLUDIOXONIL	34.6 0.052, F		
CYPRODINYL	35.6 0.051, F		
IPRODIONE	36.3 0.050, F		

Tableau 1 : Facteurs de transactivation des pesticides composant les cocktails 2, 3 et 4, vis-à-vis du PXR

entre les données expérimentales et modélisées, n'excèdent pas un facteur $\pm 1,5$ en tenant compte des incertitudes. Ainsi, pour le mélange 4 (*Figure 2*), les $EC_{vs0.5RIF}$ expérimentales sont estimées à $17.6 \mu M$ et à $26.3 \mu M$, en proportions équimolaire et réelle respectivement. Lorsque calculé par le modèle de concentration addition, ces valeurs s'élèvent à 27.6 et $18.85 \mu M$. Cela montre l'importance de l'affinité des pesticides pour le hPXR dans les mélanges, mais aussi de leurs proportions respectives dans l'effet toxicologique global.

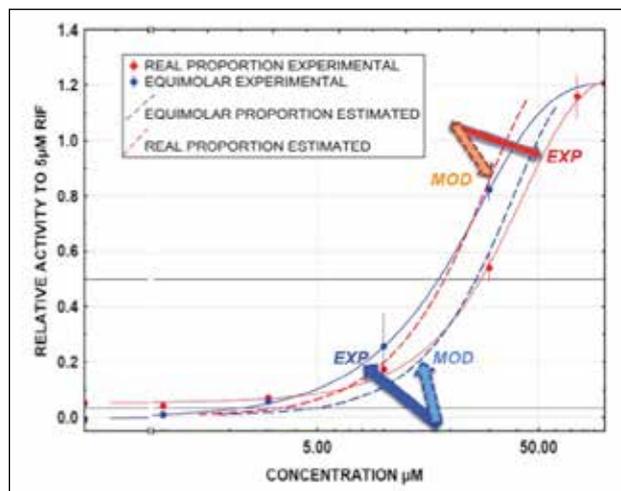


Figure 2 : Application du modèle de concentration addition aux pesticides du cocktail n°4

Interactions métaboliques

Après avoir développé et validé des méthodes de dosage par GC-MS et LC-MS/MS, nous avons analysé le métabolisme *in vitro* (*microsomes et hépatocytes d'origine humaine*) de 3 molécules (*éthion, linuron, chlorfenvinfos*). (*Figure 3*)

Nous avons pu estimer les paramètres cinétiques des molécules (K_m , V_m , *clairance intrinsèque...*), seules ou en combinaison et avons pu démontrer leurs interactions métaboliques mutuelles (*Tableau 2*). Le chlorfenvinfos semble être le composé qui subit le moins d'interactions métaboliques. Seules les combinaisons incluant le linuron et l'éthion simultanément réduisent la clairance intrinsèque

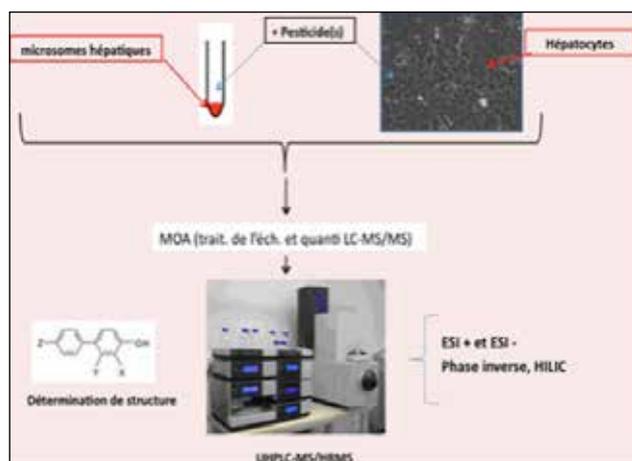


Figure 3 : Démarche expérimentale *in vitro*

de ce composé. A l'inverse, la métabolisation de l'éthion est inhibée par la présence de linuron et plus fortement par la co-incubation du chlorfenvinphos. De plus, la clairance de ce composé est fortement réduite lorsque les deux produits sont présents.

Enfin, la biotransformation de la dernière substance active est affectée par la présence individuelle d'une forte teneur en éthion et quelle que soit la quantité de chlorfenvinphos testée. Au regard des données obtenues, l'inhibition de la dégradation de ce pesticide est réduite de 70 % dans le cas de la dernière combinaison envisagée. ■

Inhibiteurs (μM)	DMSO		Ethion		Chlorfenvinphos		Mélange	
	0	4	20	4	20	4+4	20+20	
Cl_{int} Linuron	3.28	3.27	3.11	3.14	2.26	2.96	1.81	
Inhibiteurs (μM)	Linuron		Ethion		Mélange			
	0	2	10	4	20			
Cl_{int} Chlorfenvinphos	5.85	5.56	4.10	5.79	4.64	5.55	3.15	
Inhibiteurs (μM)	Linuron		Chlorfenvinphos		Mélange			
	0	2	10	4	20	2+4	10+20	
Cl_{int} éthion	5.63	5.36	5.25	5.25	4.32	5.08	3.29	

Exprimées en ml/h/mg de protéines hépatiques

Tableau 2 : Effets des co-incubations sur les clairances intrinsèques individuelles

Conclusions et perspectives

Applications envisageables en lien avec le Plan Ecophyto

Ces travaux s'inscrivent dans les priorités des axes 2 et 3 du plan Ecophyto portant sur l'étude des impacts sanitaires potentiels d'une multi-exposition aux pesticides. Ils montrent pour la première fois l'existence d'interactions métaboliques entre des pesticides en mélanges, auxquels la population française est exposée, via son alimentation, ainsi que vis-à-vis du récepteur nucléaire hPXR. Compte tenu des effets sur ce dernier, sur les gènes qu'il régule (*transport, métabolisme, survie et mort cellulaire*), et sur le devenir de ces molécules, ces interactions pourraient contribuer à des déséquilibres hormonaux. Le PXR a en effet été décrit comme pouvant intervenir dans plusieurs pathologies dont le syndrome métabolique, l'obésité et le cancer. Des interactions pharmacocinétiques et toxicologiques avec d'autres contaminants chimiques environnementaux ne sont pas à exclure, suite à des expositions multiples à ces molécules. Ces travaux devraient trouver leur intérêt pour les analyses de risque ultérieures (*Facteurs d'Equivalence Toxiques*). Ils viennent d'ouvrir la voie au contrat Européen EUROMIX dont l'originalité réside dans la définition de critères de priorisation et d'une démarche rationnelle d'évaluation toxicologique des contaminants chimiques auxquels la population européenne est multi-exposée au travers de son environnement au sens large.

Références bibliographiques

- > de Sousa G, Nawaz A, Cravedi JP, 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*. *Toxicol Sci. Sep*;141(1):234-43.
- > de Sousa G, Nawaz A, Cravedi JP, Rahmani R, 2013. Concentration addition model to assess activation of the Pregnane X receptor by pesticides mixtures found in the French diet. *Tox Letters*. Vol. 221S, p198.
- > Rahmani R, de Sousa G, Nawaz A, Cravedi JP, 2013. A Concentration Addition Model to Assess Activation of the Pregnane X Receptor (PXR) by Pesticide Mixtures Found in the French Diet. *Chemical mixtures: challenges for research and risk assessment ANSES Conference*. Maison de la RATP. Paris, 10 Décembre 2013. Communication orale sur invitation.
- > Rahmani R, de Sousa G, Cravedi JP, 2013. Etude *in vitro* des impacts cellulaires et moléculaires de mélanges de pesticides. *Journées Francophones de Nutrition*. Bordeaux, 12 Décembre 2013. Communication orale sur invitation.
- > Nawaz A, de Sousa G, Rahmani R, 2012. Use of pregnane X receptor (PXR) activation for risk assessment of pesticide mixtures using concentration addition model. *INRA Occupational Health Research Conference 2012: «Health risks associated with mixed exposures»*. 02-04 Avril 2012. Nancy.