



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse III - Paul Sabatier

Discipline ou spécialité : Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

Présentée et soutenue par Vanessa Graillot

Le 09 février 2012

Titre : *Appréciation quantitative de l'exposition alimentaire à des mélanges de pesticides et mécanismes de génotoxicité*

JURY

Mr Jean-Pierre Cravedi (directeur de thèse) - Mr Jean-Charles Leblanc (co-directeur de thèse)

Mr Pierre Lebailly (rapporteur) - Mme Sylvie Sauvaigo (rapporteur)

Mr Alain Périquet (examineur) - Mr Fabrice Nesslany (examineur)

Mr Marc Audebert (membre invité) - Mme Amélie Crépet (membre invité)

Ecole doctorale : ED SEVAB : Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

Unité de recherche : UMR 1331 Toxalim INRA - DER ANSES

Directeur(s) de Thèse : Mr Jean-Pierre Cravedi - Mr Jean-Charles Leblanc

Rapporteurs : Mr Pierre Lebailly - Mme Sylvie Sauvaigo

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Madame Sylvie Sauvaigo et Monsieur Pierre Lebailly d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail, ainsi que Messieurs Fabrice Nesslany et Alain Périquet pour leur présence dans ce jury de thèse.

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont été réalisés au sein de l'unité MeX de l'UMR 1331 ToxAlim à Toulouse, sous la direction de Jean-Pierre Cravedi et au sein de l'unité AQR-PC de l'ANSES à Maisons Alfort, sous la direction de Jean-Charles Leblanc. Je souhaite les remercier chaleureusement pour avoir dirigé ce travail tout au long de ces trois années.

Je tiens également à remercier très chaleureusement Marc Audebert, pour son aide et son implication durant cette même période. Marc, je te remercie pour l'initiation à la culture cellulaire, la génotoxicité, à l'ICW. Un grand merci pour ta présence quotidienne, ton encadrement, et ta patience.

Mes remerciements vont également vers Amélie Crépet, pour m'avoir encadrée à l'ANSES. Merci pour ta patience, pour m'avoir consacré énormément de temps pour m'initier à l'évaluation du risque, aux statistiques bayésiennes, aux calculs d'expositions.

Je tiens également à adresser tous mes remerciements, aux membres de mon comité de pilotage de thèse : Nathalie Bonvallot, Billy Amzal, Rémi Maximilien, Marc Audebert, Amélie Crépet, Antony Fastier, qui se sont réunis à plusieurs reprises pour me conseiller sur l'orientation de mes travaux. Merci pour leurs discussions enrichissantes.

Merci également à toute l'équipe AQR-PC à l'ANSES, pour leur accueil et leur bonne humeur quotidienne. Je souhaite remercier plus particulièrement Jean-Cédric pour l'aide apportée sur les nombreuses bases de données et pour tous les conseils donnés sur le logiciel SAS. Merci également à tous ceux qui m'ont aidé à l'ANSES, à Gloria Calamassi-Tran et Fanny Héraud pour m'avoir fourni une grande partie des recettes d'INCA2 et pour toute l'aide apportée.

Je remercie l'ensemble du personnel de l'UMR ToxAlim qui m'a aidé tout au long de ces deux ans et demi. Ce fut un réel plaisir de travailler avec vous tous. Merci pour votre accueil, d'avoir facilité mon intégration dans la région Toulousaine. Une petite pensée également aux sportifs du jeudi.

Merci à tous « les jeunes du labo » qui m'ont permis de passer de bons moments, tout particulièrement à Carine, Charlotte, Claire, Nadia, Robin. Un grand merci à tous les proches qui m'ont supporté dans la dernière ligne droite : Anaël, Clarisse, Edwin, Emilien, Florence, Issam, Lise. Merci pour toutes ces soirées surprises organisées aux derniers moments. Merci pour votre patience, votre soutien, votre réconfort....

Enfin, je remercie ma mère, Sylvain, ma sœur et toute ma famille, sans qui rien n'aurait été possible. Merci pour votre soutien toutes ces années et vos encouragements.

Sommaire

Remerciements	1
Sommaire	2
Liste des abréviations	5
Liste des figures	8
Listes des tableaux	9
Chapitre I :	10
Synthèse bibliographique	10
I. Analyse des risques alimentaires pour l'homme des composés chimiques.....	11
A. Identification du danger.....	12
B. Caractérisation du danger.....	13
C. Evaluation de l'exposition.....	15
D. Caractérisation du risque.....	17
II. Pesticides.....	19
A. Définitions.....	19
B. Classification et chiffres-clefs.....	20
C. Réglementation.....	21
1. Autorisation de mise sur le marché (AMM).....	21
2. Réglementation sur la teneur en résidus de pesticides dans les aliments.....	24
D. Les voies d'exposition de la population aux pesticides en France et veille sanitaire.....	25
III. Le métabolisme des xénobiotiques.....	27
A. Enzymes de phase I.....	29
1. Les monooxygénases à cytochromes P450 (CYP).....	29
2. Autres enzymes de phase I.....	31
B. Enzymes de phases II.....	31
1. UDP-glucuronyltransférase (UGT).....	31
2. Sulfotransférases.....	32
3. Glutathion S-transférases (GST).....	32
4. N-Acétyltransférases (NAT).....	32
IV. Analyse de la génotoxicité.....	33
A. La génotoxicité.....	34
1. Mutations et lésions primaires de l'ADN.....	35
2. Les différents types de mutation.....	37

3.	Lésions primaires de l'ADN.....	38
a)	Lésions oxydatives.....	38
b)	Les adduits stables et dépurinants.....	40
c)	Pontage inter et intra-brins.....	41
d)	Les cassures doubles (CDB) et simples brins (CSB).....	41
B.	Réparation de l'ADN.....	42
1.	Réparation par excision-resynthèse.....	45
a)	La réparation par excision de bases (BER).....	45
b)	La réparation par excision de nucléotides (NER).....	45
c)	Le mismatch repair (MMR).....	46
2.	Réparation des CDB.....	47
a)	Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM).....	47
b)	H2AX.....	48
c)	La recombinaison homologue (HR).....	51
d)	La recombinaison non homologue (NHEJ).....	52
C.	Contrôle du cycle cellulaire.....	55
D.	Méthodes de détection de la génotoxicité.....	57
1.	Mutation génique.....	58
a)	Mutation génique sur cellules procaryotes.....	58
b)	Mutation génique sur cellules de mammifère : test HGPRT (Forward Mutation Assay) ou TK	58
c)	Test Pig-a.....	59
2.	Test détectant les cassures et/ou les changements du nombre de chromosomes : test des micronoyaux de souris.....	60
3.	Autre test : Mesure de la synthèse non programmée de l'ADN ou UDS (unscheduled DNA synthesis).....	61
4.	Test détectant les cassures de l'ADN.....	62
a)	Test des comètes.....	62
b)	Test d'aberration chromosomique.....	63
c)	H2AX.....	63
Chapitre II :		65
Problématique et objectifs		65
I.	Evaluation du risque cumulé des pesticides.....	66
A.	Interactions entre les constituants d'un mélange.....	66
B.	Approches utilisées pour évaluer les substances ayant le même mode d'action.....	68

II.	Effets des mélanges de pesticides chez l'homme	69
III.	Objectifs de la thèse et stratégie adoptée	70
A.	Démarche expérimentale.....	70
B.	Présentation des lignées cellulaires	71
Chapitre III :	73
Détermination des principaux mélanges de pesticides auxquels la population Française a été exposée en 2006	73
I.	Présentation des données.....	74
A.	Données de consommation	74
B.	Données sur les résidus de pesticides présents dans les aliments	75
C.	Choix des couples pesticide/denrée à inclure dans l'évaluation de l'exposition.....	76
D.	Traitement des données censurées	77
II.	Co-exposition.....	78
III.	Détermination des mélanges de pesticides : développement d'un modèle statistique bayésien non paramétrique.	79
A.	Méthodes	79
B.	Résultats	79
Article 1	82
IV.	Discussion	109
Chapitre IV :	111
Etude in vitro du potentiel génotoxique des sept mélanges de pesticides	111
Article 2	113
Discussion	126
Chapitre V :	129
Identification d'une famille de pesticides génotoxiques : les methyl-pyrazoles	129
Article 3	131
Discussion	159
Chapitre VI :	161
Discussion et perspectives	161
Bibliographie	175

Liste des abréviations

2-OH-A : 2-hydroxy-adénine

8-oxoA : 8-oxo-7,8-dihydroadénine

8-oxoG : 8-oxo-7,8-dihydroguanine

AASQA : Associations Agréées de Surveillance de la Qualité de l'Air

AchE : Acétylcholine estérase

ADH : alcool déshydrogénase

ADN : acide désoxyribonucléique

AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments

Afsset : Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail

ALDH : aldéhyde déshydrogénases

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

ANSES : Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'Environnement, et du travail

ARfD : Acute Reference Dose

ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated

ATP : Adenosine-5'-triphosphate

ATR : AT-Related

BER : Réparation par Excision de Bases

BMD : benchmark dose

BrdU : bromodéoxyuridine

CKI : *cycline-dependent kinase inhibitors proteins*

CYP : Cytochrome P450

DDASS : Directions Départementales des Affaires Sanitaires et Sociales

DG Sanco : Direction Générale de la Santé et des consommateurs

DGAL : Direction Générale de l'Alimentation

DGCCRF : Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes

DGS : Direction Générale de la Santé

DIREN : Direction Régionale de l'Environnement

DIVE : Direction du végétal et de l'environnement

DJA : Dose Journalière Admissible

DJT : Dose Journalière Tolérable

DL 50 : Dose Létale 50

DMSENO : dose maximale sans effet nocif observé

DNA-PK : DNA dependant-Protein Kinase

DPR : Direction des Produits Réglementés

DSB/CDB : Double Strand breaks / cassures double brins

DSE : dose sans effet

DSENO : Dose Sans Effet Nocif Observé

EAT : Etude de l'Alimentation Totale

ECVAM : European Centre for the Validation of Alternative Methods

ERO : Espèce réactive d'oxygène

ESB : Encéphalopathie spongiforme bovine

FaPyA : 4,6-diamino-5-formamidopyrimidine

FaPyG : 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine

FMO : Flavines mono-oxygénases

FS : facteur de sécurité

GPI : glycosylphosphatidyl inositol

GST : Glutathion S-transférase

HAP : hydrocarbures aromatiques polycycliques

HGPRT : hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase

HR : Réparation Homologue

IARC/CIRC : International Agency for Research on Cancer/ Centre International de Recherche sur le Cancer

ICW : In Cell Western

INCA : étude Individuelle Nationale des Consommations Alimentaire

INCA2 : étude Individuelle Nationale des Consommations Alimentaire 2

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique

LERH : Laboratoire d'Etudes et de Recherche en Hydrologie

LMR : Limite maximale en résidus

LOD : Limit Of Detection / limite de détection

LOQ : Limit Of Quantification / limite de quantification

MAO : monoamines oxydases

MG : microgel electrophoresis

MMR : Mismatch Repair

MN : micronoyaux

MOE : margin of exposure

NAT: N-acétyltransférase

NER : Réparation par excision de nucléotides

NEAO : Niveau d'Exposition Acceptable pour l'Opérateur

NHEJ : jonction d'extrémités non homologues

NOAEL : No Observe Adverse Effect Level

OCDE : Organisation de Coopération et de Développement Economique

OGM : Organisme Génétiquement Modifié

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

pb : paires de bases

Pgp : *P-glycoprotein*

PI3K : Phosphatidyl Inositol-3 related Kinase

RCT : Réparation Couplée à la Transcription

REACH: Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals

RGG : Réparation Globale du Génome

SCE : Test d'échange de chromatides sœurs

SCG : single cell gel assay

SISE-Eaux : Système d'Information en Santé-Environnement sur les Eaux

SRPV : Services Régionaux de la Protection des Végétaux

SULT : sulfotransférases

SVF : Sérum de veau fœtal

TFT : trifluorothymidine

TK : thymidine kinase

UDS : unscheduled DNA synthesis

UGT : UDP-glucuronyltransférases

UIPP : Union des Industries de la Protection des Plantes

US-EPA : US- Environmental Protection Agency

UV : Ultra-Violet

VTR : Valeurs Toxicologiques de Références

Liste des figures

Figure 1 : Processus classique d'analyse du risque	11
Figure 2 : Principaux marchés phytopharmaceutiques Européens en 2009, en millions d'euros, d'après les données de l'UIPP	20
Figure 3 : Tonnage des substances actives vendues en France de 2002 à 2010.....	21
Figure 4 : Différentes phases du métabolisme des xénobiotiques dans la cellule.....	28
Figure 5 : Structure de la Chromatine.....	33
Figure 6 : Différentes étapes de la cancérogenèse.....	35
Figure 7 : Diversité des altérations de l'ADN.....	36
Figure 8 : Principaux dommages de l'ADN et mécanismes de réparation mis en jeu.....	36
Figure 9 : Structures des bases modifiées d'ADN.....	39
Figure 10 : Sites potentiels de la formation des adduits.....	40
Figure 11 : Mécanisme d'induction des cassures double brin d'ADN	42
Figure 12 : Les cinq principaux mécanismes de réparation de l'ADN.....	44
Figure 13 : Représentation schématique de la propagation de la phosphorylation de H2AX par MDC1 suite aux CDB d'ADN.	49
Figure 14 : Activation d'H2AX suite aux CDB d'ADN.	50
Figure 15 : Mécanismes de réparation des cassures double brin d'ADN.....	53
Figure 16 : Représentation du cycle cellulaire d'après Dolisi.....	55
Figure 17 : Représentation schématique de la signalisation cellulaire après induction de CDB d'ADN.....	56
Figure 18 : Principe du test Pig-a.....	60
Figure 19 : Représentation d'une microplaque 96 puits analysée par la technique d'ICW. ...	64
Figure 20 : Organigramme de l'approche d'évaluation de risque utilisée par US-EPA	67

Listes des tableaux

Tableau 1 : Exemples de différents types de dangers alimentaires selon leur nature.	13
Tableau 2 : Séquences d'ADN d'H2AX de différentes espèces	48
Tableau 3 : Maladies associées aux défauts de réparation et gènes affectés	54
Tableau 4 : Description des clusters d'individus et des mélanges de pesticides déterminés à partir des expositions aiguës et chroniques des adultes et des enfants, selon les deux hypothèses du traitement des données censurées.....	80
Tableau 5 : Composition des 7 mélanges de pesticides obtenus à partir des expositions aiguës des adultes et des enfants, selon l'hypothèse de censure fixée à 0.	81
Tableau 6 : liste des 7 mélanges de pesticides faisant l'objet de tests génotoxiques et proportions de chaque pesticide dans le mélange.....	112
Tableau 7 : Liste des 14 pesticides obtenus à partir de l'hypothèse du tirage aléatoire des données de contamination censurées.	130

Chapitre I :

Synthèse bibliographique

I. Analyse des risques alimentaires pour l'homme des composés chimiques

L'analyse du risque est un processus en 3 étapes qui consiste à évaluer le risque, le gérer, puis communiquer sur les mesures de la gestion des recommandations à prendre (CCA 2011) (Figure 1). La sécurité sanitaire des aliments a pour objet l'hygiène et l'innocuité des aliments par la réglementation et le contrôle des filières agroalimentaires (contaminants toxiques, agents pathogènes...). La maîtrise de la sécurité sanitaire des aliments est devenue une préoccupation majeure des consommateurs, des services publics et de l'ensemble des acteurs de la chaîne alimentaire. En France, l'évaluation des risques est assurée par l'ANSES, qui produit des avis d'expertise collective en réponse à des questions sanitaires, en provenance de ses administrations de tutelles (agriculture, environnement, santé, consommation et travail). Les ministères en charge respectivement de l'alimentation et de l'agriculture (direction générale de l'alimentation (DGAL)), de la santé (direction générale de la santé (DGS)), et de la consommation (direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (DGCCRF)), en charge de la gestion des risques, assurent la surveillance de la contamination des aliments par les agents chimiques et biologiques dans un cadre réglementaire, au travers des plans de contrôle et de surveillance.

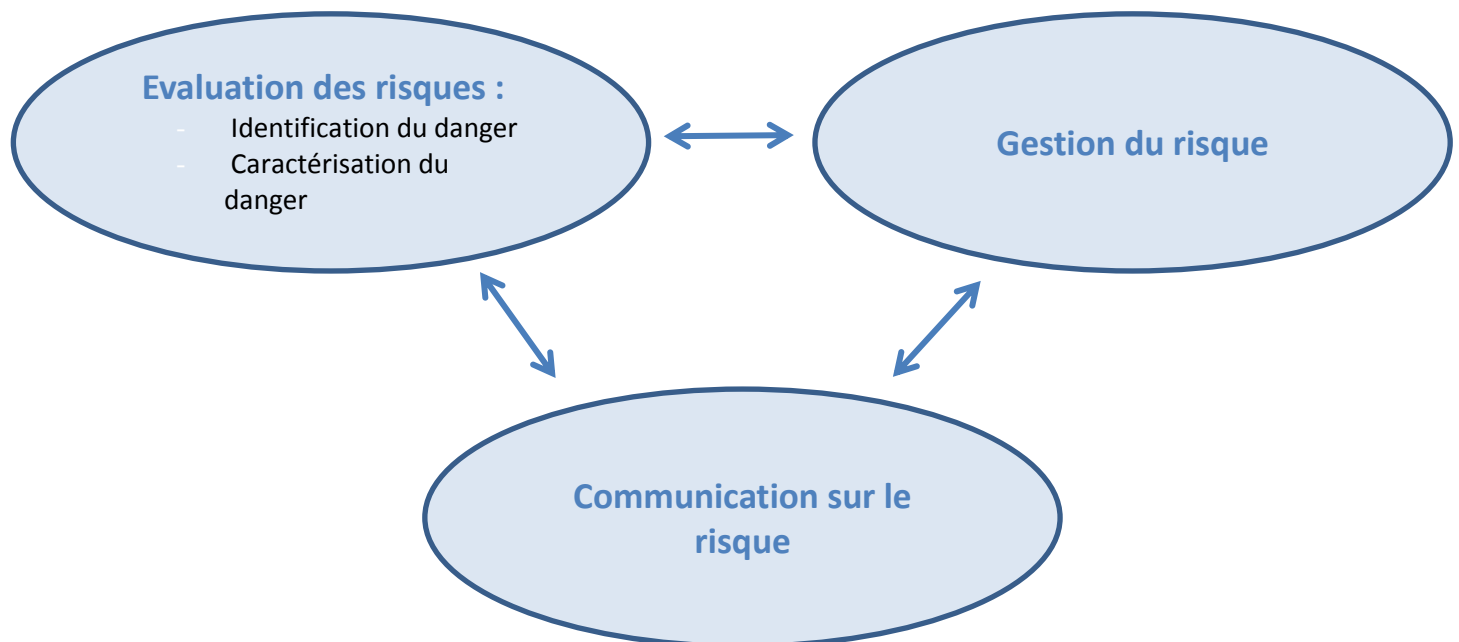


Figure 1: Processus classique d'analyse du risque (Feinberg et al. 2006)

L'évaluation du risque est une composante essentielle dans l'analyse du risque. Elle compare une exposition humaine mesurée ou modélisée à des valeurs toxicologiques de références (VTR). Les VTR sont des indices toxicologiques établis par des instances internationales (OMS, EFSA) ou des structures nationales (US EPA, Health Canada, ANSES...) ; elles sont généralement spécifiques d'un effet donné, d'une voie et d'une durée d'exposition. L'évaluation du risque s'effectue en quatre étapes. La première consiste à identifier le danger c'est-à-dire à déterminer tout agent biologique, chimique ou physique présents dans l'aliment, pouvant avoir un effet néfaste pour la santé. La deuxième consiste à caractériser le danger, c'est-à-dire à observer et mesurer les effets adverses sur la santé à l'aide d'études toxicologiques *in vivo* et *in vitro*, permettant d'établir des relations doses-effets. L'étape suivante correspond ensuite à l'évaluation de l'exposition alimentaire de la population étudiée aux contaminants alimentaires, c'est-à-dire à quantifier l'ingestion probable de ces contaminants alimentaires. Enfin la dernière étape consiste à caractériser le risque, c'est-à-dire à évaluer si la population peut être exposée à un danger encouru et quantifier si cette exposition ne présente pas de risque inacceptable au regard des référentiels toxicologiques, déterminés dans l'étape de caractérisation du danger.

A. Identification du danger

La première étape de l'évaluation du risque consiste donc à identifier tout agent biologique, chimique ou physique susceptible de provoquer des effets adverses pour la santé et qui peut être présent dans un aliment donné ou un groupe d'aliments. Parmi les agents biologiques, on peut citer le prion responsable de l'ESB (Encéphalopathie spongiforme bovine), les contaminations bactériennes, parasitaires. Parmi les substances dont on évalue le danger figurent celles introduites intentionnellement dans l'alimentation, tels que les additifs alimentaires, celles qui proviennent des traitements au cours de la production (résidus de pesticides et de médicaments vétérinaires) celles issus des procédés d'emballage ou de stockage, ou encore les polluants tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), les dioxines ou les métaux lourds (Tableau 1).

Dangers biologiques	Dangers parasitaires	Dangers chimiques	Dangers physiques
Listeria monocytogenes Staphylococcus aureus Escherichia coli Mycotoxines Phycotoxines Virus OGM Prion Allergènes alimentaires etc...	Trichines Cysticerques Tenias Douves du foie etc...	Additifs alimentaire Arômes Dioxine Médicaments vétérinaires Métaux lourds Migrants d’emballage Nanoparticules Nitrates Nitrosamines Pesticides HAP etc...	Objets métalliques Objets plastiques etc...

Tableau 1 : Exemples de différents types de dangers alimentaires selon leur nature.

B. Caractérisation du danger

La caractérisation du danger correspond à l'évaluation qualitative et/ou quantitative des effets adverses sur la structure ou la fonction des cellules, des tissus, des organes de l'organisme, associés aux différents contaminants qui peuvent être présents dans un aliment. Ainsi, les mécanismes d'action du toxique ainsi que sa cinétique dans l'organisme (absorption, distribution, métabolisation, élimination) sont étudiés. Pour les agents chimiques, on évalue la relation dose/réponse, c'est-à-dire, que l'on détermine la relation entre l'exposition à un danger (dose) et l'intensité des effets adverses qui en résultent pour la santé ou bien la probabilité de réagir (réponse).

Deux types de toxicité sont observés : la toxicité avec seuil, où les doses critiques peuvent être déterminées, et la toxicité sans seuil. L'effet avec seuil est un effet qui survient au delà d'une certaine dose administrée de produit. En deçà de cette dose, le risque est considéré comme nul. Les effets sans seuil correspondent aux effets qui interviennent à des doses extrêmement faibles et qui entraînent des dommages non réparables par l'organisme. C'est le cas par exemple des substances génotoxiques, qui dès les premiers dommages sur l'ADN pourront soit entraîner des mutations transmissibles à la descendance, soit induire un processus de cancérogenèse. Il est alors impossible pour les toxicologues d'établir une dose admissible ou une dose tolérable. Dans ce cas, on procède par approches probabilistes, à l'aide de modélisation de données expérimentales afin d'extrapoler vers le domaine des faibles doses.

Dans le cas d'effets avec seuils, de nombreuses VTR par substance peuvent être déterminées. On identifie deux types de toxicité, la toxicité aiguë et la toxicité chronique. Dans le cadre d'une exposition alimentaire, la toxicité aiguë correspond aux effets néfastes survenus rapidement après l'administration d'un composé. La toxicité chronique correspond quant à elle à l'administration répétée de contaminants alimentaires, pendant une longue période (généralement supérieure à 3 mois). En règle générale, il est convenu que les effets toxiques d'une substance chez les animaux de laboratoire sont également supposés se produire chez l'Homme. En conséquence et du fait de la difficulté de disposer d'études épidémiologiques pertinentes, les études animales sont la principale source de données toxicologiques. Au cours de ces expérimentations, le recours à des doses élevées permet d'observer des signes de toxicité, assurant une meilleure appréciation de l'organe cible et d'un effet spécifique. Une valeur toxicologique de référence, la dose létale 50 (DL 50), qui correspond à la dose qui engendre 50 % de mortalité chez les animaux peut être observée. Une autre VTR, la dose maximale sans effet nocif observé (DMSENO) ou NOAEL (No Observed Adverse Effect Level), peut également être déterminée à partir d'études animales. En pratique, cette VTR est une dose administrée, inférieure au seuil biologique, mais les moyens mis en œuvre dans les études permettent difficilement d'atteindre un tel niveau de détection. Une détermination statistique est alors mise en œuvre pour affiner cette valeur.

La « *benchmark dose* » (ou BMD), est une méthode alternative de plus en plus utilisée pour s'affranchir de la variabilité due aux expérimentations animales lors de l'utilisation de la NOAEL comme dose critique. L'objectif est de déterminer la dose produisant un effet critique avec une augmentation de la fréquence ou de la sévérité particulière, conventionnellement fixée à 1, 5 ou 10 %. Il s'agit d'une méthode qui estime la dose critique mais ne permet pas l'extrapolation aux faibles doses (IPCS 2009).

Pour une exposition par voie orale, les VTR sont exprimées en masse de substance par kilogramme de poids corporel et par jour (mg/kg pc/j). Ces valeurs sont définies comme étant l'estimation de la quantité de produit à laquelle un individu peut théoriquement être exposé (par ingestion) sans effet néfaste, pendant une durée déterminée et sur la base de toutes les informations actuelles.

La dose de référence aiguë (ARfD (Acute Reference Dose)), désigne la quantité maximum de substance active (résidus de pesticides) qui peut être ingérée par le consommateur pendant une courte période (c'est à dire au cours d'un repas ou d'un jour, dans la nourriture ou l'eau de boisson), sans effet dangereux pour sa santé. Elle est calculée à partir d'une dose sans effet observé (DSE) et d'un facteur de sécurité (FS). La DSE choisie pour le calcul est issue de l'étude la plus appropriée sur

une espèce animale sensible et représentative. Le facteur de sécurité tient compte de la variabilité intra et inter-espèce et de la nature des effets de la substance (Solecki et al. 2005).

La Dose Journalière Admissible (DJA) correspond à la quantité d'additif ou de contaminant pouvant être ingérée par une personne quotidiennement tout le long de sa vie, sans qu'aucun effet indésirable ne se manifeste (IPCS 2009). Elle est alors obtenue à partir de la NOAEL divisée par un facteur de sécurité (entre 100 et 1000), afin de tenir compte de la variabilité inter et intra-espèce. Dans le cas de substances présentes dans les aliments dont la présence n'est pas désirée, mais inévitable, la Dose Journalière Tolérable (DJT) est alors utilisée.

C. Evaluation de l'exposition

L'homme est fréquemment exposé à de nombreuses substances chimiques par la voie alimentaire. L'évaluation de l'exposition est une étape importante dans l'évaluation du risque. En effet, la caractérisation du danger, qui est réalisée en amont, se fait pour partie à partir d'études réglementaires, qui font l'objet d'un consensus international. En revanche, dans l'évaluation de l'exposition, la précision de l'évaluation dépend de la méthodologie et des données utilisées, qui peut différer d'un État à un autre. Ainsi, il existe au niveau Européen pour les produits phytosanitaires, une harmonisation des méthodes d'évaluation du risque chronique et aigu (EFSA 2008d), ainsi qu'une harmonisation des données concernant la présence de résidus de pesticides dans les aliments, avec un programme de pré-régulation (autorisation a priori des substances) et un programme de suivi post-régulation (contrôle a posteriori). Les analyses chimiques pour cette surveillance des aliments sont effectuées par chaque États membres par des laboratoires agréés (EFSA 2008c).

L'évaluation de l'exposition correspond à l'évaluation quantitative de la dose probable ingérée de contaminants alimentaires, c'est-à-dire qu'elle correspond à la concentration de l'agent dans l'aliment multipliée par la quantité d'aliment consommée pendant un repas, une journée (exposition aiguë) ou sur la vie (exposition chronique) (Crépet and Tressou 2011; IPCS 2009; Nougadere et al. 2011; WHO 2009). L'exposition peut se mesurer directement à l'aide de bio-marqueurs, comme par exemple en mesurant chez l'homme les concentrations des composés recherchés ou de leurs métabolites (Egeghy et al. 2011; Sirot et al. 2009a), dans les fluides corporels (sang, urine, lait maternel). À défaut d'être directement déterminée à l'aide de bio-marqueurs, celle-ci est évaluée de façon indirecte à partir d'enquêtes de consommations alimentaires individuelles et de données sur la présence et niveaux des résidus dans les aliments. Différentes enquêtes alimentaires ont été menées, pour d'une part, vérifier les niveaux en additifs, résidus de pesticides,

toxines, contaminants environnementaux susceptibles d'être présents dans les aliments, et d'autre part, pour estimer les expositions à ces substances. Au sein de l'ANSES, plusieurs enquêtes sont disponibles pour évaluer l'exposition de la population française aux contaminants alimentaires :

INCA 2 : (Etude Individuelle Nationale des Consommations Alimentaires). Réalisée entre 2005 et 2007, elle regroupe les données de consommations alimentaires sur 7 jours consécutifs de plus de 4000 participants, adultes et enfants, habitant en France métropolitaine (Afssa 2009; Dubuisson et al. 2010; Lioret et al. 2010). Cette base de données a été utilisée pour évaluer la co-exposition aux pesticides de la population Française. Elle est décrite de façon plus détaillée dans le chapitre III de ce manuscrit.

Concernant la teneur en contaminant dans les aliments, l'ANSES dispose essentiellement de deux types de données, qu'elle utilise couramment pour caractériser l'exposition « bruit de fond » de la population française, dans ses produits d'expertise:

La première provient des programmes de surveillance et de contrôle des résidus de pesticides dans les aliments bruts (non transformés) à la production, effectués par les ministères chargés de la consommation, de l'agriculture et de la santé. Cette base de données regroupe les teneurs en résidus de pesticides de nombreux aliments sur plusieurs années. L'intérêt d'utiliser ces données est de pouvoir disposer de données annuelles actualisées, qui tiennent compte des pratiques culturales. En effet, différents types de pesticides seront utilisés d'une année sur l'autre selon les conditions climatiques. Par exemple la campagne agricole de 2007 a vu une utilisation en pesticides et un chiffre d'affaire augmentés par rapport à l'année précédente, du fait de fortes attaques parasitaires liées aux conditions climatiques exceptionnelles. En effet, l'utilisation de fongicides et d'herbicides ont alors connu une forte hausse (4,7 % et 6,5 %) tandis que les insecticides ont diminué de 5,1% (UIPP 2008).

Le deuxième type de données correspond aux études menées par l'ANSES sur l'alimentation totale (EAT), à partir d'aliments transformés « tels que consommés » par le consommateur, c'est-à-dire que les analyses ont été effectuées après lavage, épluchage et cuisson des aliments. La première étude (EAT1) réalisée entre 2000 et 2004 par l'Institut national de la recherche agronomique (INRA), en collaboration avec l'ANSES, a visé l'analyse des teneurs en contaminants inorganiques, minéraux ainsi que les mycotoxines des aliments échantillonnés (Leblanc et al. 2004). Cette étude a été récemment actualisée par l'EAT 2. La recherche des teneurs en contaminants s'est effectuée de 2006 à 2010, de la même façon que pour EAT 1, à partir d'aliments « tels que consommés ». L'échantillonnage alimentaire a été déterminé préalablement à partir des données de l'étude INCA2

et prélevé dans toute la France. Ainsi, 20 000 produits alimentaires représentant 212 types d'aliments ont été collectés. Contrairement à la base de données des programmes de surveillance et de contrôle des résidus de pesticides, 445 substances d'intérêt ont été recherchées et choisies en tenant compte de différents critères : enjeux d'évaluation des risques pour différentes substances, description de l'évolution dans le temps des expositions. Parmi les contaminants alimentaires, 283 substances recherchées sont des résidus de pesticides (ANSES 2011a; Sirot et al. 2009b).

Pour l'étude de la co-exposition, seul le premier type de données, à savoir celui des programmes de surveillance et de contrôles, a été utilisé. La deuxième étude EAT2 étant en cours de réalisation, les données analytiques n'étaient pas toutes disponibles. De plus, celle-ci n'est pas pertinente pour évaluer l'exposition aiguë.

Deux types d'approches sont utilisés pour évaluer l'exposition : l'approche déterministe et l'approche probabiliste. Si le nombre de données de contamination dans l'aliment est important, on dispose de la distribution qui permet d'évaluer la variabilité de la contamination. À partir de la distribution, plusieurs grandeurs peuvent alors être calculées : la moyenne, l'écart type, les percentiles, le minimum, le maximum... L'approche déterministe est utilisée pour quantifier le risque d'une façon « grossière » : lors du calcul de l'exposition, la valeur de contamination fixe est généralement soit la moyenne des valeurs de contamination pour l'exposition chronique, soit celle fixée au 95^{ème} percentile pour le calcul des expositions aiguës (Feinberg et al. 2006; IPCS 2009). L'approche probabiliste, quant à elle, tient compte de l'ensemble de la courbe de distribution, donc de la variabilité, en procédant à des tirages aléatoires dans chacune des distributions de contamination (Chapitre III).

D. Caractérisation du risque

Il s'agit de la dernière étape de l'évaluation du risque, qui consiste à estimer qualitativement et/ou quantitativement pour une population donnée, la probabilité de la fréquence et de la gravité des effets adverses connus ou potentiels sur la santé, susceptible de se produire après ingestion du contaminant. La caractérisation du risque consiste donc à combiner la caractérisation du danger avec l'évaluation de l'exposition. Les valeurs d'exposition sont alors comparées aux VTR pour conclure sur un risque éventuel. Ainsi, deux cas sont observables : soit l'exposition est plus basse que la VTR, il n'y aura donc pas de risque ; soit l'exposition dépasse la VTR et il y a un risque non nul qu'il convient de préciser ou quantifier, en sorte de permettre d'apporter les éléments scientifiques indispensables aux gestionnaires du risque, pour mettre en œuvre les moyens utiles à la diminution de ce risque observé chez les populations cibles.

Dans le cas des substances mutagènes et cancérogènes génotoxiques, comme il n'est pas possible de définir une dose pour laquelle il n'y aurait aucun risque, différentes approches sont mises en œuvre. La première est l'utilisation de la courbe dose-réponse obtenue après une étude de carcinogénicité chez l'animal à fortes doses. L'extrapolation d'un effet à faible dose se fait à partir d'extrapolation linéaire. L'autre approche préconisée par l'EFSA et l'OMS est celle des marges d'exposition (« margin of exposure (MOE)). Elle consiste à déterminer des MOE, obtenues en divisant une valeur de référence (ex NOAEL) par l'exposition (EFSA 2005b; IPCS 2009; van der Voet et al. 2007).

II. Pesticides

Les pesticides ont pour rôle de protéger les productions agricoles contre les ravageurs des cultures (bactéries, champignons, virus, insectes...) et les mauvaises herbes, pouvant ralentir le bon développement de la plante. L'utilisation de ces substances a permis d'améliorer le rendement des récoltes, mais également d'améliorer la qualité sanitaire des aliments pour le consommateur (Damalas and Eleftherohorinos 2011).

A. Définitions

Le terme pesticide est une appellation générique, qui désigne les substances actives ou les préparations utilisées pour la prévention, le contrôle ou l'élimination d'organismes jugés indésirables, qu'il s'agisse de plantes, d'animaux, de champignons ou de bactéries. Ce terme englobe les usages agricoles, domestiques, urbains, de voirie... Selon leurs utilisations, on distingue les produits phytopharmaceutiques (Directive 91/414/CE), des biocides (Directive 98/8/CE).

On distingue également les substances actives des préparations qui sont définies par la directive 91/414/CE comme étant « Les substances ou micro-organismes, y compris les virus exerçant une action générale ou spécifique sur les organismes nuisibles ou sur les végétaux, parties de végétaux ou produits végétaux ». Les préparations quant à elles sont définies comme étant « des mélanges ou solutions composées de deux ou plusieurs substances, dont au moins une substance active, destinés à être utilisés comme produits phytopharmaceutiques ».

Les résidus de pesticides sont également définis par cette même directive comme étant « une ou plusieurs substances présentes dans ou sur des végétaux ou produits d'origine végétale, des produits comestibles d'origine animale, ou ailleurs dans l'environnement, et constituant le reliquat de l'emploi d'un produit phytopharmaceutique, y compris leurs métabolites et produits issus de la dégradation ou de la réaction ».

Les produits biocides dont l'usage est non agricole, sont quant à eux, définis par la directive européenne 98/8/CE, comme étant « les substances actives et les préparations contenant une ou plusieurs substances actives qui sont présentées sous la forme dans laquelle elles sont livrées à l'utilisateur, qui sont destinées à détruire, repousser ou rendre inoffensifs les organismes nuisibles, à

en prévenir l'action ou à les combattre de toute autre manière, par une action chimique ou biologique ».

Le travail présenté ici concerne uniquement les substances utilisées dans le cadre agricole et ne concerne donc pas les produits biocides. Le terme « pesticides » couramment utilisé dans ce manuscrit est un synonyme de produits phytopharmaceutiques et concerne uniquement les substances actives.

B. Classification et chiffres-clefs

La classification des pesticides est effectuée selon leur fonction, la cible et le mode d'action, puis selon la famille chimique. Il existe plus d'une vingtaine de catégories répertoriées, dont les trois principales sont les herbicides, les insecticides et les fongicides (Figure 2). À celles-ci s'ajoutent les acaricides, bactéricides, nématicides, molluscicides, rodenticides, taupicides et les répulsifs. Les substances actives sont ensuite classées d'après leur nature chimique. Les principales familles sont les organochlorés, les organophosphorés, les carbamates, les dithiocarbamates, les pyréthriinoïdes, les triazines et les urées substituées.

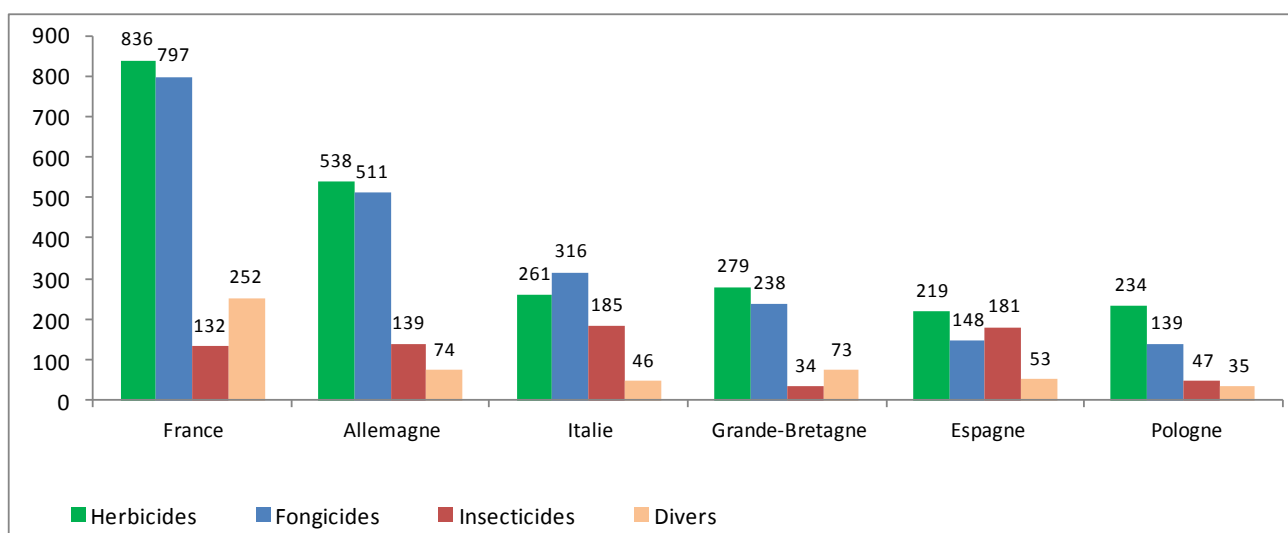


Figure 2 : Principaux marchés phytopharmaceutiques Européens en 2009, en millions d'euros, d'après les données de l'UIPP

Chaque année, l'Union des Industries de la Protection des Plantes (UIPP) publie les chiffres concernant l'utilisation et la production de produits phytosanitaires. En 2010, la France était le premier consommateur européen avec 61 900 tonnes de matières actives vendues (UIPP 2011) (Figure 2 et 3). Depuis 2009, l'utilisation et la vente de pesticides ont fortement diminué, (Figure 3), d'une part à cause d'une pression parasitaire faible, d'autre part par le retrait en 2008 de nombreuses substances actives et préparations du marché. Enfin, les substances actives mises récemment sur le marché, sont efficaces à des concentrations plus faibles que les anciennes substances qui ont été remplacées.

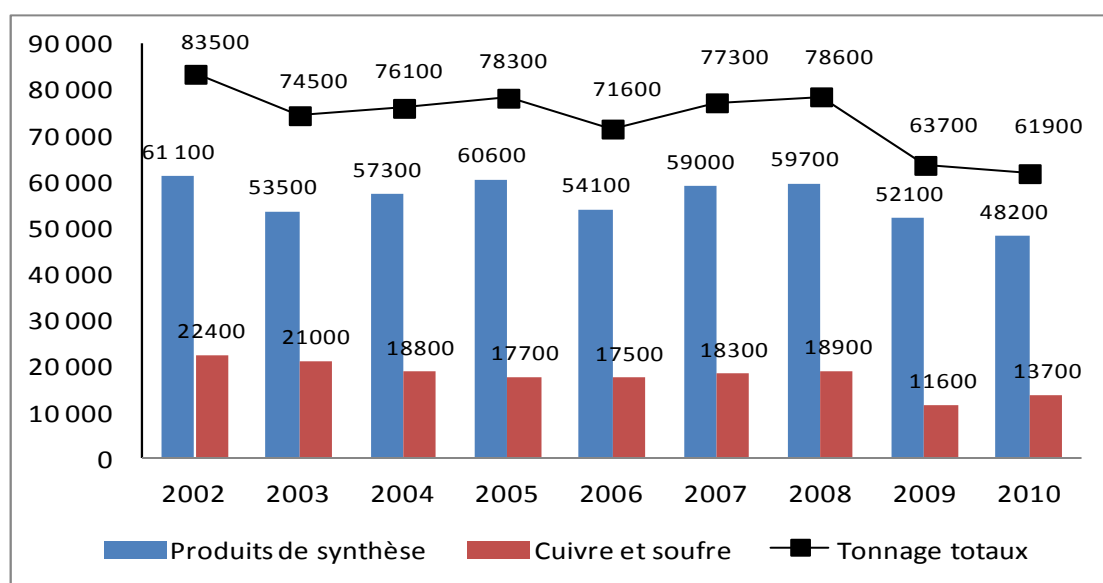


Figure 3 : Tonnage des substances actives vendues en France de 2002 à 2010 (selon le rapport de l'UIPP 2010/2011).

C. Réglementation

1. Autorisation de mise sur le marché (AMM)

Un vaste ensemble de textes législatifs européens régit la commercialisation et l'utilisation des produits phytopharmaceutiques et leurs résidus dans les denrées alimentaires (aliments et eaux de consommation).

La mise sur le marché et le suivi post-homologation étaient encadrés et harmonisés au niveau européen par la directive 91/414/CE, qui précisait la liste des substances autorisées (Annexe I), les conditions à remplir pour l'inscription d'un dossier d'insertion d'une substance active dans cette annexe, ainsi que les conditions à remplir pour introduire le dossier d'autorisation d'un produit phytopharmaceutique. Depuis le 14 juin 2011, le nouveau règlement 1107/2009, qui est l'un des 4 textes du « paquet pesticides » adopté le 21 octobre 2009, vise à réduire les risques liés aux

pesticides ainsi que leur utilisation et ce dans une mesure compatible avec la protection des cultures, est entré en vigueur et abroge la directive 91/414/CE. Ce règlement est basé sur l'ancienne directive. Les principaux apports du règlement sont : des critères d'exclusion plus stricts pour l'approbation des substances, une homologation européenne des phytoprotecteurs, synergistes, coformulants et adjuvants.

Chaque État membre désigne une ou plusieurs autorités compétentes en charge des dossiers d'homologation des produits phytosanitaires. En France, l'autorité compétente est l'ANSES (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement, et du travail, ex-Afssa et Afsset) *via* la Direction des Produits Réglementés (DPR) (ex-DIVE, Direction du végétal et de l'environnement). Actuellement, on compte plus de 300 substances actives homologuées (Base de données de la Communauté Européenne DG-Sanco disponible en ligne, EU pesticides database, septembre 2011) qui entrent dans la composition de nombreuses préparations commerciales. Les substances actives une fois homologuées étaient inscrites dans l'annexe I de la directive Européenne 91/414 pour une durée maximale de 10 ans, pour une première approbation.

L'autorisation de la mise sur le marché (AMM) d'une préparation est délivrée par les Etats membres sur la base d'une évaluation nationale, après l'étude du dossier toxicologique et écotoxicologique (vérification de l'innocuité du produit à l'égard de la santé publique et de l'environnement) et l'étude du dossier montrant l'efficacité et la sélectivité à l'égard des végétaux et produits végétaux.

En ce qui concerne le dossier toxicologique, il contient les informations résultant d'une batterie de tests imposés par la réglementation qui comprend :

- Des tests de toxicité aiguë (toxicité orale, dermale, inhalatoire, irritation de la peau, des yeux, sensibilité de la peau)
- Des tests de toxicité à court terme (étude de 28 et 90 jours par voie orale et autres voies)
- Des essais de génotoxicité (*in vitro* et *in vivo* (développé dans le paragraphe III))
- Des tests de toxicité à long terme et cancérogénèse
- Des tests de reproduction
- Des études sur plusieurs générations
- Des études de développement
- Des études de neurotoxicité
- D'autres études toxicologiques telles que l'étude de la toxicité des métabolites
- Enfin, le dossier comporte des données médicales lorsqu'elles peuvent être disponibles (Surveillance médicale du personnel de l'usine de production, observation directe, par exemple cas clinique et cas d'empoisonnement...)

Ces données sont disponibles dans la base de données AGRITOX, actualisée par la DPR, qui fournit pour chaque substance active phytopharmaceutique homologuée, les propriétés physiques et chimiques, les données de toxicité (par exemple la DL50), d'écotoxicité, le devenir dans l'environnement et les données réglementaires (Limite maximale en résidus (LMR), DJA, DSENO, ...), qui proviennent en grande partie des dossiers d'AMM.

Différents organismes (US EPA, CIRC etc.) proposent une classification qualitative et évolutive des composés cancérigènes et/ou mutagènes, basée sur des études épidémiologiques et des expérimentations animales. La classification de l'Union Européenne (règlement 1272/2008) distingue trois catégories de composés cancérigènes (1A, 1B, 2) et trois catégories de composés mutagènes (1A, 1B, 2). Pour les substances cancérigènes, la catégorie 1A correspond aux substances cancérigènes pour l'homme, la catégorie 1B aux substances devant être assimilées à des substances cancérigènes pour l'homme et la catégorie 2 aux substances préoccupantes pour l'homme en raison d'effets cancérigènes possibles. La catégorie 1 des substances mutagènes correspond aux substances dont la capacité d'induire des mutations héréditaires est avérée ou qui sont à considérer comme induisant des mutations héréditaires dans les cellules germinales des êtres humains. La catégorie 2 correspond aux substances préoccupantes du fait qu'elles pourraient induire des mutations héréditaires dans les cellules germinales des êtres humains. Les substances actives ayant un effet génotoxique (catégorie 1) ou génotoxique cancérigène avéré, à partir de tests toxicologiques, font l'objet d'un refus d'autorisation de mise sur le marché. Actuellement, parmi les substances autorisées, seuls le carbendazil est classé comme mutagène en catégorie 1B et le thiophanate-méthyl en catégorie 2 (base de données européenne DG sanco ; règlement 1107/2009). Par ailleurs aucun pesticide autorisé n'est classé comme carcinogène en catégorie 1. Seulement 20 substances parmi plus des 300 autorisées, sont classées en catégorie 2 (captan, chlorothalonil, chlorotoluron, chlorpropham, dimoxystrobin, diuron, epoxiconazole, etridiazole, folpet, forchlorfenuron, iprodione, isoproturon, kresoxim-méthyl, linuron, mepanipyrim, molinate, profoxydim, propyzamide, pymetrozine, tepraloxym) (base de données européenne DG sanco ; règlement 1107/2009).

L'autorisation de la mise sur le marché d'une préparation est délivrée pour une durée de 10 ans. Passé ce délai, la société doit effectuer une demande de renouvellement d'AMM, et les dossiers doivent ensuite être réexaminés par les autorités compétentes. En cas de retrait d'autorisation, le fabricant doit alors cesser la commercialisation du produit. Un délai peut être accordé afin d'éliminer ou écouler les stocks.

2. Réglementation sur la teneur en résidus de pesticides dans les aliments

Concernant les teneurs en résidus des pesticides dans les aliments, le règlement européen 396/2005 fixe des limites maximales en résidus (LMR), qui dans les conditions normales d'utilisation assure la sécurité du consommateur. Ces limites sont fixées pour chaque substance et pour chaque denrée, sur la base d'essais effectués en champs, en suivant les bonnes pratiques agricoles, mais en se mettant dans les conditions les plus critiques d'utilisation et sur la base de l'exposition la plus faible, permettant ainsi de protéger tous les consommateurs, même les plus vulnérables. Le respect de ces valeurs permet alors d'obtenir une « norme » de qualité qui permet de définir si les aliments prélevés chez les producteurs et dans les circuits de distribution sont conformes ou non lors des contrôles de qualité des aliments. Depuis 2008, l'Europe a harmonisé ces LMR qui étaient au préalable déterminées séparément par chaque État membre (Règlement (CE) N° 396/2005).

Les teneurs en résidus des pesticides dans l'eau de consommation sont réglementées par les directives européennes 98/83/CE et 75/440/CEE. Les limites de qualité sont fixées dans l'eau au robinet du consommateur à 0,10 µg/L pour chaque pesticide (à l'exception de l'aldrine, la dieldrine, l'heptachlore et de l'heptachloroépoxyde : 0,03 µg/L) et ne doit pas dépasser 0,50 µg/L pour le total des substances mesurées (Directive 75/440/CEE 1975; Directive 98/83/CE 1998). Ces limites de qualité réglementaires de l'eau au robinet du consommateur sont plus strictes, que celles fixées par les normes de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS).

D. Les voies d'exposition de la population aux pesticides en France et veille sanitaire

L'exposition aux pesticides peut se faire par diverses voies d'exposition (voie cutanée, orale, et respiratoire). On distingue deux types d'exposition :

- Une exposition directe : elle concerne les personnes manipulant directement les pesticides. Il s'agit la plupart du temps d'une exposition professionnelle due essentiellement à l'emploi des pesticides (préparation des solutions de traitement, dilution des préparations), traitement des cultures (épandage sur les cultures), nettoyage des appareils de traitement, mais aussi suite aux récoltes des fruits et légumes. Elle peut également concerner la population générale par l'utilisation de produits phytopharmaceutiques à usage domestique et entretien des jardins.
- Une exposition indirecte : principalement due à l'alimentation par la présence de résidus dans les aliments et plus faiblement par l'eau consommés (EFSA 2008c) et l'environnement (Bouvier et al. 2006).

Différentes études ont été menées en France pour déterminer l'exposition ainsi que les niveaux d'imprégnation en pesticides dans l'organisme (Expope, ENNS, Hibiscus, Pélégie, Timoun, Eden). Les données de surveillance des milieux disponibles aujourd'hui concernent principalement l'eau et les denrées alimentaires. À l'heure actuelle, peu de mesures de contamination des sols et de l'air sont effectuées pour renseigner correctement ces voies d'exposition et déterminer les niveaux d'exposition de la population générale (Études Aasqa (Associations Agréées de Surveillance de la Qualité de l'Air), programme Habit'air) (ORP and ANSES 2011).

En France, la surveillance des résidus de pesticides dans les aliments est réalisée par plusieurs organismes :

- La surveillance dans les denrées d'origine animale est effectuée par la Direction Générale de l'Alimentation (DGAI) du Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation.
- La surveillance des denrées végétales, est assurée par la DGCCRF et par les Services Régionaux de la Protection des Végétaux (SRPV).
- Enfin, la surveillance dans les eaux est effectuée par la Direction Générale de la Santé (DGS) du Ministère de la santé, en collaborant avec des réseaux divers tels que les Agences de l'eau, les Directions Départementales des Affaires Sanitaires et Sociales (DDASS), la Direction Régionale de l'Environnement (DIREN). L'ensemble des résultats d'analyses réalisées dans le cadre du contrôle sanitaire alimente la base nationale de

données SISE-Eaux (Système d'Information en Santé-Environnement sur les Eaux) du Ministère chargé de la santé.

La surveillance des pesticides dans l'air est réalisée par un certain nombre d'Associations Agréées de Surveillance de la Qualité de l'Air (AASQA).

Dans cette étude, nous avons évalué uniquement l'exposition de la population générale aux pesticides par l'alimentation, en tenant compte des contaminations des aliments et de l'eau. L'exposition indirecte *via* l'environnement et l'air ainsi que l'exposition professionnelle n'ont pas été abordées.

III. Le métabolisme des xénobiotiques

Le terme xénobiotique désigne une molécule exogène à laquelle l'Homme (ou tout autre organisme) peut être directement ou indirectement exposé. Il peut s'agir de produits naturels tels que les toxines, des produits néoformés, mais également des médicaments, ou encore des polluants environnementaux tels que les pesticides.

La membrane cellulaire est une barrière efficace protégeant la cellule contre les xénobiotiques hydrosolubles. À l'inverse, les molécules lipophiles ont la faculté de franchir cette membrane par diffusion passive et peuvent s'accumuler dans les tissus et devenir ainsi toxiques. Après leur absorption, par voie orale, cutanée ou respiratoire, les xénobiotiques sont donc distribués dans l'organisme, puis éventuellement métabolisés avant d'être éliminés. Le métabolisme constitue le premier système de défense de l'organisme vis-à-vis des agents qui l'agressent. Il a pour rôle d'inactiver les composés toxiques, mais aussi de faciliter leur élimination en particulier pour ceux qui sont lipophiles, qu'il transforme en métabolites hydrophiles, aisément excrétés dans l'urine ou la bile. Cependant, dans certains cas, certains métabolites sont plus réactifs que la molécule dont ils sont issus, et constituent alors des substances capables d'altérer les macromolécules cellulaires (cas de certains HAP, du 2 aminoanthracène, de l'aflatoxine B1, etc. (Boehme et al. 2010; Glatt 2000; Glatt et al. 2000)).

Le foie est le principal organe en matière de biotransformation des xénobiotiques (Court et al. 2011; Thiebaud et al. 2011), mais d'autres tissus ou organes tels que les poumons, le tractus digestif, la peau, ou les reins sont bien équipés en enzymes de biotransformation (Baron et al. 2001; Canturk et al. 2010; Guéguen et al. 2006; Knight et al. 2007; Pons et al. 2000; Zalko et al. 2011).

Les enzymes sont classées en deux catégories : les enzymes de phase I (réaction d'oxydoréduction) et les enzymes de phase II (réaction de conjugaison). Les enzymes de phase I catalysent des réactions de fonctionnalisation majoritairement par des mono-oxygénases à cytochrome P450 (CYP), mais également à flavine et des peroxydases. Les enzymes de phase II catalysent la conjugaison du composé initial ou de son métabolite avec un composé endogène pour faciliter son élimination. La régulation de ces enzymes se fait après activation de récepteurs nucléaires par les xénobiotiques, tels que les récepteurs des prégnanes (Pregnane X Receptor - PXR), des acides gras poly-insaturés (Peroxisome Proliferative activated Receptor - PPAR), de l'androstérone (Constitutive Androstane Receptor - CAR) et de la dioxine (Aryl hydrocarbon Receptor - AhR) (Guéguen et al. 2006; Rushmore and Kong 2002; Tompkins and Wallace 2007).

Il existe une dernière étape, la phase III qui permet l'élimination du xénobiotique ou de composés conjugués, à travers la membrane plasmique dans la bile et l'urine, à l'aide de transporteurs comme par exemple la P-glycoprotéine (Pgp) (Guéguen et al. 2006; Thiebaud et al. 2011).

Le profil d'expression des enzymes du métabolisme des xénobiotiques varie en fonction des espèces mais aussi des individus (Zanelli et al. 2011; Zhou et al. 2010). On peut observer une polymorphie d'activité : seule l'activité de la protéine est modifiée (augmentation ou une diminution de l'activité), l'expression du gène et la quantité de protéines sont inchangées.

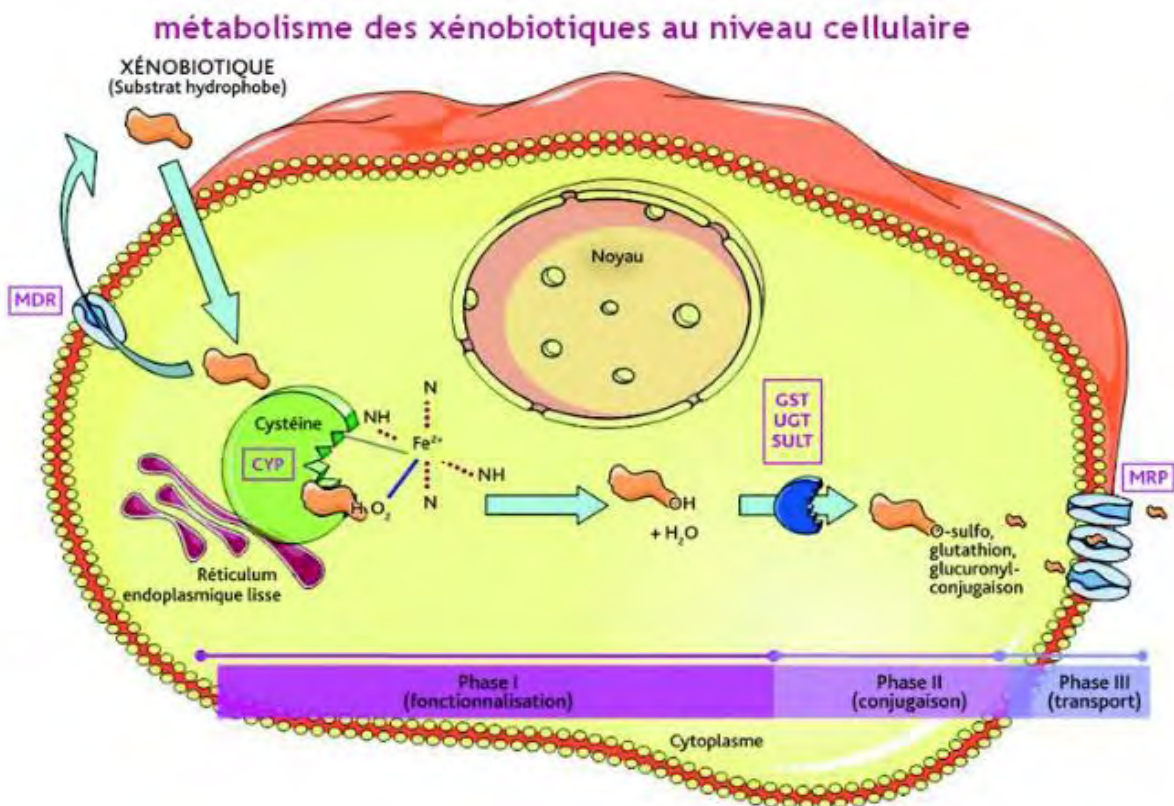


Figure 4 : Différentes phases du métabolisme des xénobiotiques dans la cellule (d'après Rouas et Guéguen).

Les xénobiotiques pénètrent dans la cellule par diffusion passive (phase 0). Ils sont ensuite pris en charge par les enzymes de phase I, dites de fonctionnalisation, puis de phase II (conjugaison). Leur excretion se fait ensuite à l'aide de transporteurs membranaires (phase III). <http://www.irsn.fr/EN/Research/publications-documentation/Aktis/envirhom/xenobiotic/Pages/xeno1.aspx>.

A. Enzymes de phase I

1. Les monooxygénases à cytochromes P450 (CYP)

Les cytochromes P450 sont une famille d'iso-enzymes impliqués dans le métabolisme oxydatif de molécules très diverses, comprenant à la fois des xénobiotiques et des substances endogènes (e.g. stéroïdes, acides gras, vitamines (Liska 1998)). Les cytochromes P450 sont des enzymes membranaires localisées dans le réticulum endoplasmique lisse (Figure 4).

La nomenclature des gènes qui codent pour les cytochromes P450 (CYP) comprend 3 niveaux : si l'homologie de séquence est supérieure à 40 %, un CYP est considéré de la même famille et est classé par un chiffre. Le deuxième niveau correspond à la sous famille et le dernier au numéro d'ordre (Nebert et al. 1987; Nelson et al. 1996). Les CYP impliqués majoritairement dans la biotransformation des xénobiotiques font partie des classes 1, 2, 3. La famille 4 est peu impliquée dans la métabolisation des substances étrangères à l'organisme. Parmi les 17 familles de CYP connues chez les mammifères, les formes prépondérantes chez l'Homme, sont représentées par les sous-familles CYP3A, CYP2C et CYP1A (Guéguen et al. 2006).

Leur distribution est différente d'un organe à l'autre (Iwanari et al. 2002; Sarikaya et al. 2006). De plus, leur expression peut être constitutive ou inductible. L'exposition à des mélanges de pesticides perturbe par exemple l'expression des CYP (Canistro et al. 2008). De même, le profil d'expression peut différer entre individus sains et malades (Canturk et al. 2010; Zhou et al. 2010). Un CYP est très rarement spécifique d'un substrat : il métabolise plusieurs substrats différents et un substrat peut être métabolisé par plusieurs CYP. Le CYP1A1 qui est inductible par les HAP et les dioxines constitue de ce fait un biomarqueur d'exposition à ces polluants (Baron et al. 2001). Le CYP3A4 humain joue un rôle majeur dans le métabolisme oxydatif des médicaments (il est responsable du métabolisme de plus de 50 % des xénobiotiques) (Rodriguez-Antona et al. 2007; Westerink and Schoonen 2007a).

Les études métaboliques se font couramment *in vivo* sur différents modèles animaux, (e.g. rongeurs, chien, singe, poissons, petits ruminants). Ces études peuvent être longues, coûteuses et peuvent demander un nombre important d'animaux. Par ailleurs, le profil d'expression variant d'une espèce à l'autre (Wu et al. 2011), les résultats obtenus peuvent être difficilement extrapolable à l'Homme (Kurebayashi et al. 2010). Afin de diminuer les expérimentations animales, et de bénéficier de résultats plus distinctifs du métabolisme chez l'Homme, des études *in vitro* peuvent être envisagées à partir de modèles humains.

In vitro, l'étude du métabolisme des composés par les enzymes de phase I se fait principalement à partir de microsomes de foie. Néanmoins, de nombreuses cellules hépatiques peuvent être utilisées :

- Des hépatocytes primaires fraîchement préparés ou décongelés peuvent être un bon modèle d'étude du métabolisme, car ils ont conservé l'ensemble des CYP. Ils peuvent être d'origine humaine, mais ont pour inconvénient une expression différente entre individus (Dumont et al. 2011; Zanelli et al. 2011; Zhang et al. 2006). C'est pourquoi des pools d'hépatocytes provenant de différents individus sont couramment utilisés (Zanelli et al. 2011). Par ailleurs, il est coûteux ou difficile d'obtenir des hépatocytes humains.
- De nombreuses lignées cellulaires humaines provenant d'hépatomes de foie peuvent être utilisées pour l'étude du métabolisme parmi lesquelles on peut citer les lignées cellulaires HepG2, Hep3B, HCC-T, HCC-M, Huh-7, HepaRG. L'inconvénient d'utiliser des lignées cellulaires est la perte d'expression de certains CYP, car elles proviennent en général de cellules cancéreuses qui au cours du temps ont perdu certaines fonctionnalités. La lignée cellulaire hépatocytaire la plus utilisée est la lignée HepG2. Il a été montré qu'elles avaient de nombreuses caractéristiques génotypique et phénotypique de cellules de foie normal (Knasmuller et al. 1998; Westerink and Schoonen 2007a) et une large variété de réponses métaboliques à différentes sortes de médicaments (Knasmuller et al. 1998). La lignée HepaRG, qui provient d'un hépatome humain, est capable, lorsqu'elle est différenciée en « hépatocyte-like » et cultivée en co-culture avec des cellules biliaires, d'exprimer les CYP majeurs impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques, (Guillouzo et al. 2007; Parent et al. 2004; Zanelli et al. 2011).

2. Autres enzymes de phase I

Parmi les enzymes de phase I, on distingue également :

- Les Flavines à mono-oxygénases (FMO) qui sont situées dans le réticulum endoplasmique et participent à l'oxydation des composés azotés, soufrés, ou phosphorés. *In vitro*, seulement quelques isoformes sont présentes chez les hépatocytes primaires et la lignée HepaRG (Hart et al. 2010).
- Les alcools et aldéhydes déshydrogénases (ADH et ALDH) : qui catalysent l'oxydation de fonction alcool en aldéhyde ou cétone, puis en acides carboxyliques. Elles sont présentes chez les hépatocytes primaires, la lignée HepaRG et les HepG2 (Hart et al. 2010).
- Les monoamines oxydases (MAO) qui catalysent la désamination oxydative des amines primaires pour former des aldéhydes (Rendu et al. 2011).
- Les estérases qui interviennent dans l'hydrolyse des fonctions esters, libérant les fonctions alcool et acide carboxylique correspondantes.
- Les époxydes hydrolases qui détoxifient les époxydes par hydratation et formation de diols (Decker et al. 2009).

B. Enzymes de phases II

Les enzymes de phase II catalysent le transfert de diverses molécules endogènes (UDP-glucuronosyl, glutathion, sulfate, N-acétyl) sur les groupements fonctionnels des xénobiotiques, souvent après une première réaction de phase I. La glucuronidation est quantitativement la plus importante réaction de phase II et elle se réalise au niveau du réticulum endoplasmique.

1. UDP-glucuronyltransférase (UGT)

La glucuroconjugaison est catalysée par des UDP-glucuronyltransférases, qui favorisent la fixation de l'acide glucuronique sur un atome d'oxygène, d'azote ou de soufre d'une molécule, pour former des conjugués glucuronides. Les UGT font partie intégrante de la membrane du réticulum endoplasmique. On distingue 2 familles d'UGT sur la base de leur séquence. Les membres de la famille UGT1 utilisent une large gamme de substrats endogènes et exogènes. Les enzymes de la famille UGT2 ont entre autres comme substrats les composés stéroïdiens. Le foie est l'organe qui contient le plus d'UGT et la forme la plus abondante est l'UGT2B4 (40 % des UGT totales chez l'adulte

et 90 % chez le fœtus). Elles sont également présentes dans l'intestin (formes prédominantes : 2A3, 1A10, 1A1, 1A6 et 2B7) et le côlon (1A10 et 2A3) (Court et al. 2011).

2. Sulfotransférases

La conjugaison de l'ion sulfate avec les substrats endogènes ou exogènes est catalysée par les sulfotransférases cytosoliques (SULT), et elle constitue une voie métabolique importante pour les neurotransmetteurs ou les composés phénoliques (Glatt 2000; Lindsay et al. 2008). Le foie et l'intestin grêle contiennent la plus forte concentration de sulfotransférases tandis que les poumons et les reins possèdent de faibles activités.

3. Glutathion S-transférases (GST)

Les glutathion S-transférases sont présentes dans les fractions cytosoliques et microsomiales, principalement de foie et d'intestin grêle (Higgins and Hayes 2011). *In vitro*, elles sont également retrouvées dans les lignées HepG2 et LS-174T (Westerink and Schoonen 2007b). Trois classes de GST sont distinguées, les isoformes basiques (alpha), neutres (mu) et acides (pi). Le foie contient principalement les isoformes alpha et mu tandis que les isoformes alpha et pi se trouvent dans l'intestin grêle.

4. N-Acétyltransférases (NAT)

Les N-acétyltransférases sont des enzymes cytosoliques responsables de la biotransformation de divers composés (amines aromatiques, hydrazines, etc.). Deux isoenzymes ont été identifiées chez l'Homme (NAT1 et NAT2) (Walker et al. 2009). La NAT1 est exprimée de façon monomorphique (invariant) dans la majorité des tissus de l'organisme. L'activité de la NAT1 peut être modulée par divers facteurs, comme l'âge, le sexe, la maladie, le régime alimentaire et les xénobiotiques. NAT2 est présente principalement dans le foie et l'intestin et elle est sujette à un polymorphisme génétique. La NAT2 est impliquée dans le métabolisme des arylamines, des hydrazines et de la caféine.

In vitro, il a été montré que les hépatocytes primaires humains, les lignées HepG2 et HepaRG possédaient les enzymes de phase II, principalement des UGT, GST et SULT (Audebert et al. 2011; Court et al. 2011; Guillouzo et al. 2007; Hart et al. 2010; Knasmuller et al. 1998; Westerink and Schoonen 2007b).

IV. Analyse de la génotoxicité

L'ADN est une macromolécule essentielle, constituée de nucléotides. Elle est le support du matériel génétique et permet la transmission des informations génétiques de cellule à cellule et de génération en génération. L'ADN code la totalité des fonctions cellulaires, et est constitué de deux brins antiparallèles formant une double hélice. Chaque cellule humaine contient dans son noyau 46 chromosomes, chacun formé d'une molécule unique d'ADN. Chaque chromosome contient environ $1,3 \cdot 10^9$ paires de bases (pb) d'ADN, alors que le noyau cellulaire ne fait environ que $10 \mu\text{m}$ de diamètre. Par conséquent, l'ADN doit être condensé (Figure 5). La double hélice est compactée à deux niveaux. Le premier niveau de compaction correspond à l'association de l'ADN avec des protéines, dites histones, hautement conservées dans l'évolution, qui contiennent une forte proportion d'acides aminés arginine ou lysine. Les protéines qui sont alors chargées positivement se fixent étroitement aux groupements phosphates de l'ADN, qui sont chargés négativement. Une longueur de 146 pb d'ADN est entourée d'un octamère de protéines constitué de deux molécules de chacune des quatre différentes histones (H2A, H2B, H3 et H4) pour former le nucléosome (deux copies des histones H3 et H4, deux dimères des histones H2A H2B) (Bonner et al. 2008). Le deuxième niveau de compactage correspond à la fixation d'une 5^{ème} histone (H1) qui se fixe à l'ADN et relie les nucléosomes entre eux pour former la chromatine (Figure 5). Dans les cellules vivantes, les protéines histones subissent en permanence des modifications covalentes affectant principalement leur partie N-terminale (acétylation, méthylation, polyribosylation, ubiquitinylation, phosphorylation) (Fukuda et al. 2006).

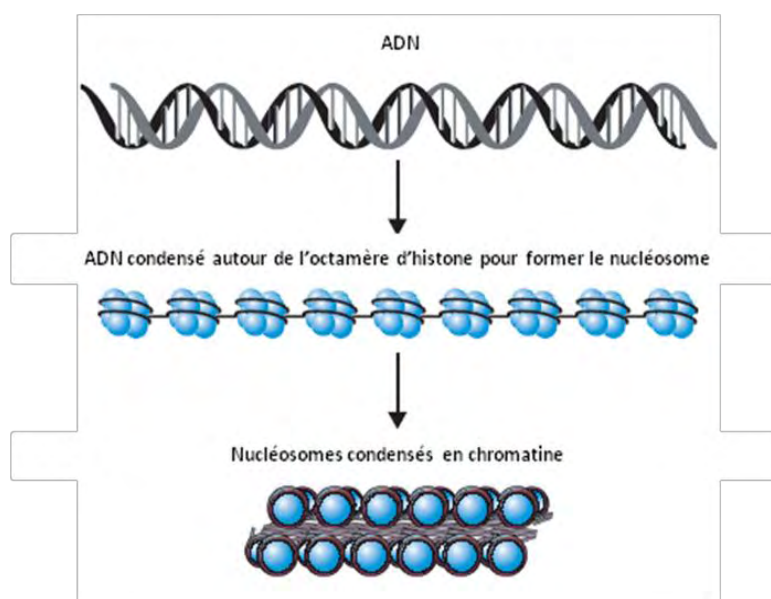


Figure 5 : Structure de la Chromatine.

(<http://www.newmediaway.com/what-is-nucleosomes>). L'ADN est compacté à un premier niveau à l'aide d'histones pour former le nucléosome. Dans un deuxième temps la fixation d'une cinquième histone au nucléosome permet la formation de la chromatine.

A. La génotoxicité

La toxicologie génétique, ou génotoxicité, est l'étude des dommages causés par un agent physique ou chimique, à la molécule d'ADN ou aux composés cellulaires associés (fuseaux mitotiques). Les modifications du matériel génétique causées par ces dommages, dans le cas où ils ne sont pas ou sont mal réparés, pourront alors avoir des conséquences délétères sur l'organisme (Elespuru and Sankaranarayanan 2007). Pour que les dommages conduisent à des mutations, ils doivent persister dans l'ADN après un cycle de réplication. Une mutation peut être de forte amplitude (impliquant des réarrangements importants) ou très ponctuelle (n'affecte qu'une ou quelques paires de bases) (Elespuru and Sankaranarayanan 2007). Les effets seront différents en fonction de la localisation de la mutation : si elle touche les cellules germinales, elle peut occasionner un défaut génétique héréditaire, alors que si elle affecte les cellules somatiques, elle peut être à l'origine de l'initiation d'un processus de cancérogénèse (Erickson 2010). Ce processus comprend quatre étapes différentes aboutissant au développement d'un cancer : les phases d'initiation, de promotion, de progression, d'invasion (Figure 6). L'étape d'initiation est la première étape qui correspond à une mutation pendant la division cellulaire. La deuxième étape du processus de cancérogénèse, correspond à la promotion, qui est un état de latence pouvant durer entre 10 et 30 ans pour l'Homme. La progression correspond à une division anarchique des cellules pouvant aller jusqu'au stade de l'invasion des tissus voisins (métastases) (Kufe et al. 2003).

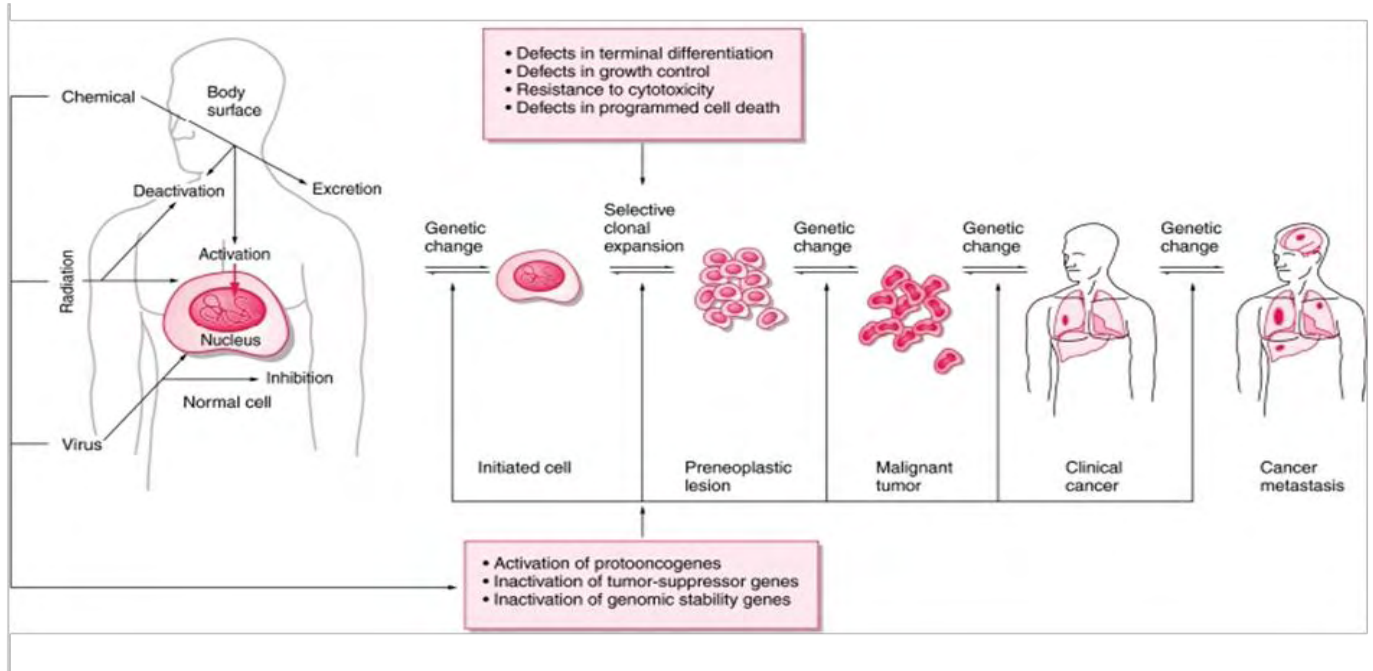


Figure 6 : Différentes étapes de la cancérogenèse (d'après Kufe et al, Holland-Frei Cancer Medicine. 6th edition, 2003).

Les agents génotoxiques participent à l'initiation du cancer en introduisant dans l'ADN des lésions, transmissibles au génome des cellules filles lors de la division cellulaire. Ils peuvent également participer à la phase de progression de la tumeur. De plus, l'accumulation de dommages à l'ADN dans les cellules somatiques peut jouer un rôle dans le processus de vieillissement accéléré, le dysfonctionnement de l'immunité, des maladies cardiovasculaires et neurodégénératives (De Flora and Izzotti 2007; Hoeijmakers 2009; Slatter and Gennery 2010).

1. Mutations et lésions primaires de l'ADN

Les dommages de l'ADN ont pour origine des changements de bases spontanées endogènes (dépurination, désamination, erreurs lors du processus de réplication de l'ADN), ou sont induits par des agents chimiques ou physiques présents dans notre environnement (Orsière et al. 2005). L'altération du matériel génétique peut se traduire de différentes façons selon les agents qui réagissent avec l'ADN. On peut observer en fonction des agents génotoxiques, des cassures double et simple brins, la formation d'adduits aux bases de l'ADN, une alkylation ou une oxydation de la molécule d'ADN, des pontages inter ou intra brin et des mésappariements de bases (Figures 7 et 8).

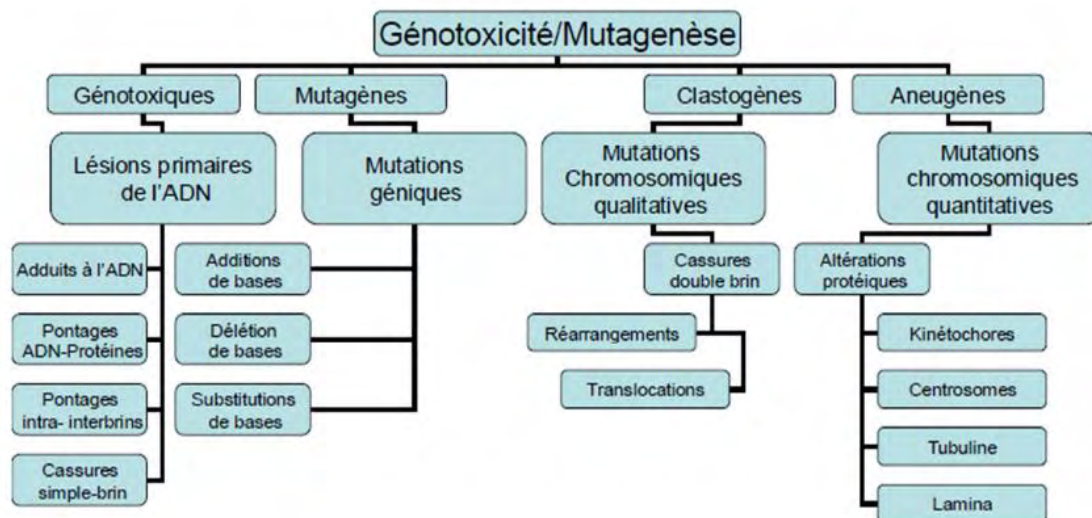


Figure 7 : Diversité des altérations de l'ADN (d'après Orsière, 2005)

Ces dommages peuvent bloquer les processus de réplication et/ou de transcription de l'ADN. De plus, ces modifications de l'ADN peuvent avoir lieu soit de façon directe par les xénobiotiques ou agents physiques, soit de façon indirecte après leur biotransformation.

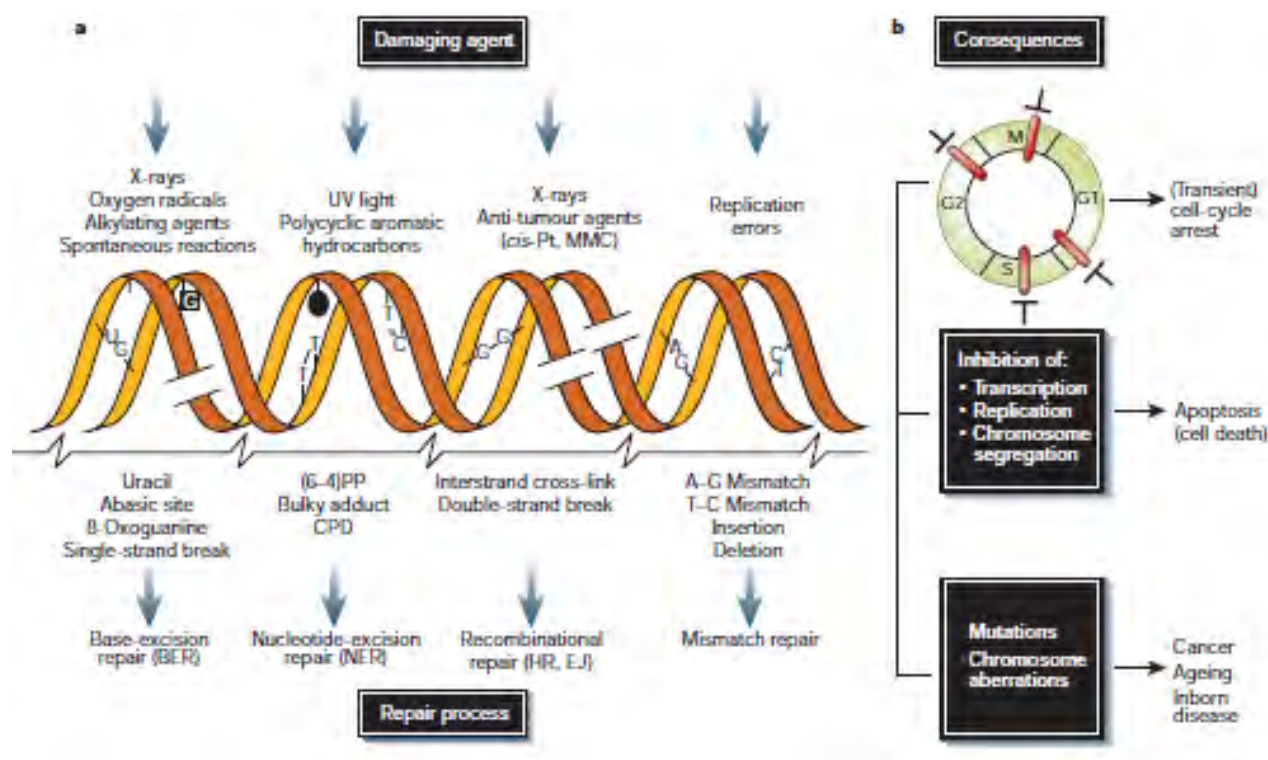


Figure 8 : Principaux dommages de l'ADN et mécanismes de réparation mis en jeu (d'après Hoeijmakers, 2001)

2. Les différents types de mutation

Les agents mutagènes sont des agents chimiques ou physiques, naturels ou synthétiques, qui peuvent être soit clastogènes (altèrent les chromosomes), soit génotoxiques (altèrent les gènes). Trois types de mutations sont observés selon leur localisation :

Les mutations géniques peuvent résulter de substitutions de paires de bases : transitions (substitution d'une base purique par une autre base purique ou substitution d'une base pyrimidine par une autre base pyrimidine), ou transversions (inversion entre une base purique et pyrimidine) et de décalage du sens de lecture (frameshift) (Figure 8).

Les substitutions de paires de bases donneront lieu à des mutations ponctuelles. En revanche, le décalage du cadre de lecture, qui est dû à l'insertion ou la délétion d'une ou plusieurs paires nucléotidiques, aura pour effet possible de modifier un gène ou un groupe de gènes, pouvant ensuite modifier l'expression et la régulation de nombreux autres, mais surtout aboutir à des protéines tronquées, non fonctionnelles. Ces mutations sont provoquées par des agents génotoxiques suite à des erreurs de réplication ou de réparation des dommages engendrés.

Les mutations chromosomiques sont provoquées par des agents dit clastogènes (cassure du chromosome). Ces agents altèrent la structure des chromosomes suite à des cassures de la double hélice d'ADN entraînant des pertes de chromosomes (partielles ou entières), des aberrations structurales et des translocations chromosomiques, qui auront pour effet d'affecter des dizaines, voire des centaines de gènes (Iarmarcovai et al. 2007). Étant donné que la régulation de l'activité d'un gène dépend en partie de sa localisation dans le génome, les mutations chromosomiques ont en général des effets considérables, car elles éliminent une partie du gène, ou modifient le moment où un gène donné est activé ou désactivé. Parmi les composés clastogènes connus, on peut citer la mitomycine C (Whitwell et al. 2010).

Les mutations génomiques sont provoquées par des agents dits aneugènes (changement du nombre de chromosomes) (Iarmarcovai et al. 2007). Ces agents perturbent la ségrégation des chromosomes durant la méiose ou la mitose, provoquant une mauvaise distribution du matériel génétique dans les cellules filles. On parle alors d'aneuploïdie pour tout écart par rapport au nombre diploïde (ou haploïde) normal de chromosomes. Les mutations génomiques sont néfastes pour un organisme, car elles modifient l'équilibre des fonctions de milliers de gènes. On peut citer comme exemple le cas de la trisomie 21 : un gain de chromosome est observé dans la paire n°21. La colchicine, est un exemple d'agent aneugène (Attia 2011; Whitwell et al. 2010).

3. Lésions primaires de l'ADN

a) Lésions oxydatives

Les produits endogènes générés par une cellule normale perturbent en permanence l'intégrité de l'ADN et peuvent également induire des cassures simple ou double brin, des adduits covalents, des sites abasiques et des mutations. Parmi les produits endogènes on trouve les espèces réactives de l'oxygène (ERO) (anions superoxyde, radicaux libre et H_2O_2) provenant de la respiration oxydative et les produits résultant de peroxydation lipidique (Klaunig et al. 2011). Les ERO peuvent modifier les bases purines et pyrimidines. Les dérivés majeurs de l'oxydation de l'adénine sont la 8-oxo-7,8-dihydroadénine (8-oxoA) (Ziech et al. 2011), la 4,6-diamino-5-formamidopyrimidine (FaPyA) et la 2-hydroxy-adénine (2-OH-A) (Figure 9). Les dérivés de la guanine sont les plus abondants dans la cellule du fait que la guanine est plus réactive à l'oxydation par les ERO. Les deux principaux dérivés sont la 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoG) (Radak et al. 2011; Wiseman and Halliwell 1996) et la 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine (FaPyG) (Ziech et al. 2011). Parmi les modifications des bases pyrimidines, on peut citer la formation de glycol de thymine qui est létale pour la cellule car cette lésion bloque la réplication de l'ADN (Basu et al. 1989).

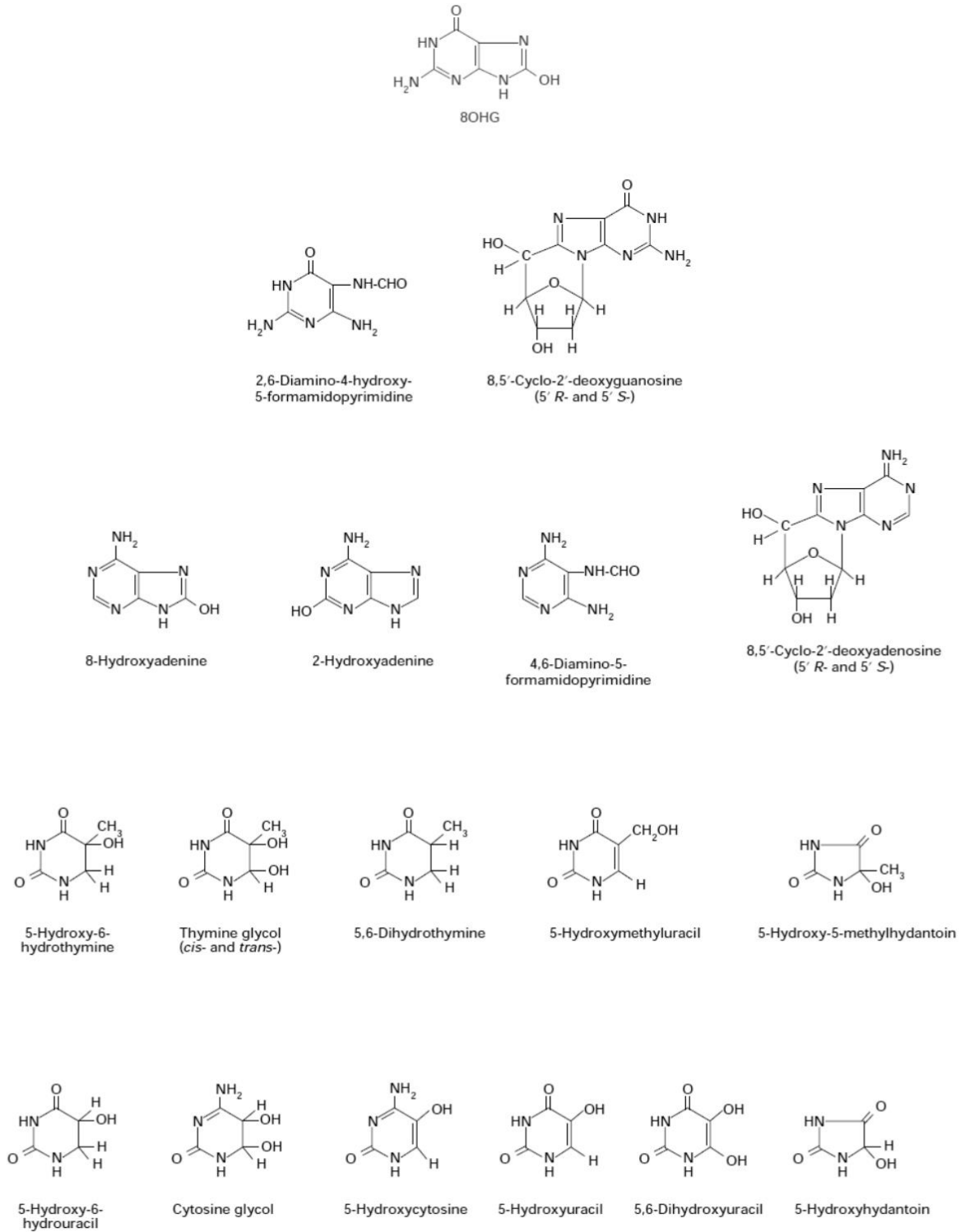


Figure 9 : Structures des bases modifiées d'ADN (d'après Wiseman et Halliwell, 1996)

b) Les adduits stables et dépurinants

L'ADN est une chaîne constituée de nucléotides, dont la structure est nucléophile. Par réaction d'alkylation, certains xénobiotiques ou leurs métabolites vont fixer un groupement alkyl de manière covalente sur l'ADN et former des adduits. Les composés génotoxiques vont pouvoir se fixer sur les sites nucléophiles de l'ADN (atomes d'azote, d'oxygène, et de carbone des bases pyrimidiques (thymine, cytosine) et puriques (adénine ou guanine)) (Figure 10). Il existe 18 sites potentiels impliqués dans la formation d'adduits (Faucet-Marquis 2005). Le site d'attaque majoritaire des composés génotoxiques est la guanine. Les xénobiotiques peuvent alors former deux types d'adduits : des adduits stables qui restent fixés à l'ADN à moins d'être pris en charge par les systèmes de réparation, et des adduits dit « dépurinants » qui sont relâchés par déstabilisation de la liaison N-glycosyl ou glycosylique (Dipple 1995). La perte d'une base entraîne alors la formation d'un site apurique ou apyrimidique, communément nommé abasique, qui peut ensuite générer des mutations, ainsi que des erreurs lors de leur réparation et des cassures simple brin. On peut citer les HAP et l'aflatoxine B1 comme exemples de substances formant des adduits stables à l'ADN (de Kok et al. 2002; Koc and Swenberg 2002; Mao et al. 1998; Tarantini et al. 2011) et les nitrosamines présents dans le tabac comme adduits dépurinants (Peterson 2010).

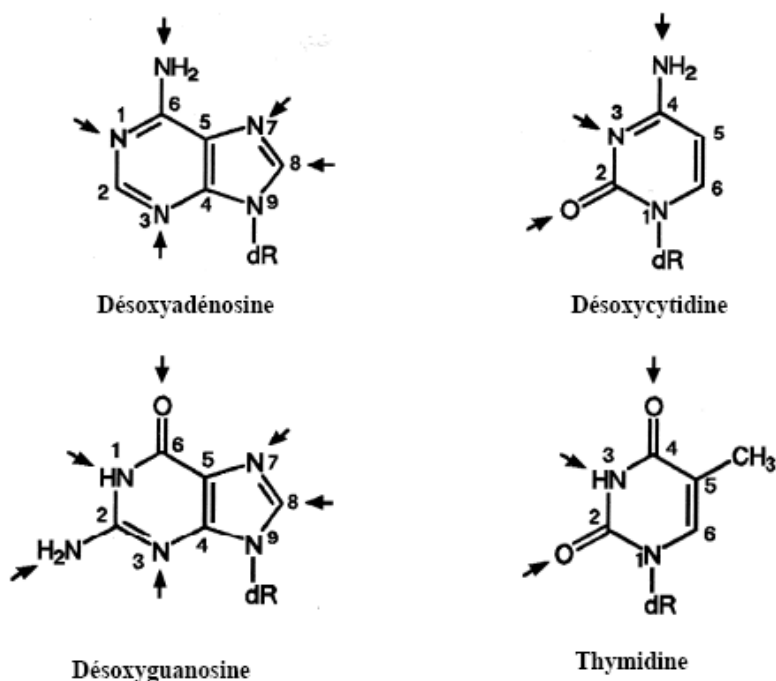


Figure 10 : Sites potentiels de la formation des adduits (d'après Faucet-Marquis, 2005)

c) Pontage inter et intra-brins

Des pontages inter-brins entre bases puriques et pyrimidines peuvent se produire après l'action d'anti-tumoraux telle que la mitomycine C. Les pontages intra-brins sont créés suite à une exposition à des rayons UV, entraînant la formation d'un dimère de pyrimidine. Ils peuvent également se produire après l'action d'anti-tumoraux tels que les moutardes azotées (Jackson and Bartek 2009). Comme pour les CDB, ils auront pour effet de bloquer la transcription et la réplication de l'ADN.

d) Les cassures doubles (CDB) et simples brins (CSB)

Les cassures simple et double brins de l'ADN peuvent être induites par des radiations ionisantes, par divers agents anti tumoraux (bléomycine, néocarzinostatine) ou par des inhibiteurs de topoisomérase (etoposide, camptothécine) (Figure 8 et Figure 11) (Bonner et al. 2008; Caldecott 2008; Iarmarcovai et al. 2007). Lorsque deux cassures simple brin ont lieu à proximité l'un de l'autre, elles peuvent former une cassure double brin (Figure 11). Elles ont également lieu durant la réparation des pontages interbrins et lors de la réparation de l'ADN. Les CDB de l'ADN correspondent à l'un des dommages les plus délétères pour la cellule, car elles peuvent causer des modifications de structure de la chromatine, et de sévères pertes de l'information génétique (Khanna and Jackson 2001).

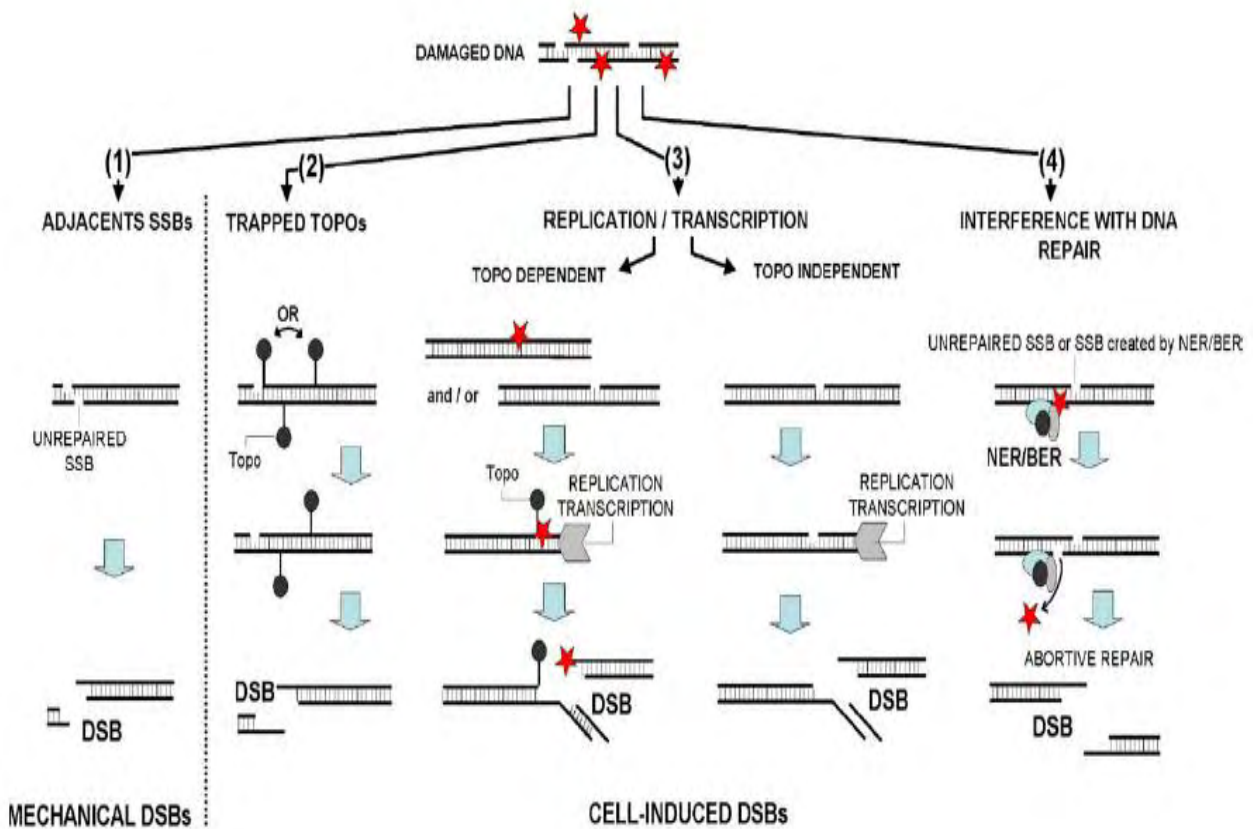


Figure 11 : Mécanisme d'induction des cassures double brin d'ADN

(d'après Sedelnikova et al., 2010)

B. Réparation de l'ADN

Le maintien de l'intégrité du génome est essentiel à la transmission fidèle du patrimoine génétique. Lorsque l'ADN est altéré, différentes possibilités s'offrent à la cellule : s'il n'y a pas de possibilité de réparation de l'ADN, la cellule peut entrer dans un processus d'apoptose conduisant à sa mort ; s'il y a une réparation correcte de l'ADN, la cellule va alors se diviser ; enfin si la cellule n'a pas ou mal réparé la lésion, elle va se diviser, entraînant l'apparition d'une mutation (Figure 8). Une fréquence de mutation trop élevée remettrait en question la capacité de survie des individus ou des espèces. C'est pourquoi, les cellules possèdent plusieurs points de contrôles tout au long du cycle cellulaire (Figure 12), afin que des mécanismes de réparation de l'ADN interviennent et réparent la majeure partie des altérations détectées avant la duplication du génome.

La diversité des types de lésions nécessite différentes voies de réparations de l'ADN. Le processus de réparation repose sur l'identification des dommages par la cellule, suivi d'une cascade de signalisation cellulaire aboutissant au mécanisme de réparation. Dans certains cas, le processus de réparation repose sur la structure de l'ADN en double hélice : lorsqu'un brin a subi des dommages, le deuxième brin intact sert à la réparation du premier endommagé (réparation homologue). La réparation des dommages de l'ADN est divisée en quatre catégories : la réparation in situ des dommages, la réparation par excision-resynthèse, la réparation des CDB et la réparation translésionnelle. Seuls les principaux mécanismes de réparation présents chez l'Homme sont présentés dans ce document (Figure 12).

Mécanismes de réparation

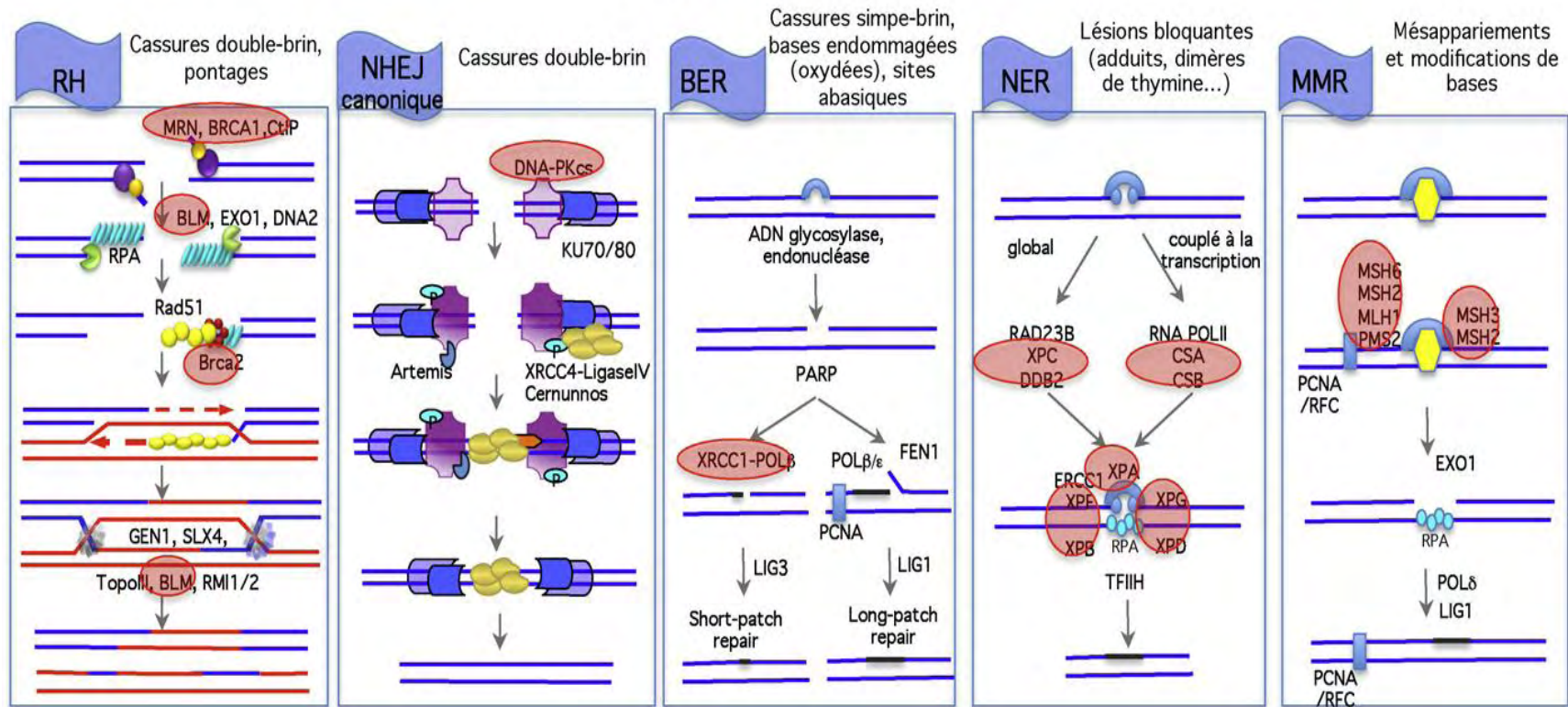


Figure 12 : Les cinq principaux mécanismes de réparation de l'ADN (d'après Rass *et al.*, 2011)

1. Réparation par excision-resynthèse

Trois processus ont été identifiés dans la réparation de l'ADN par excision-resynthèse : la réparation par excision de bases (BER), par excision de nucléotides (NER) et le mismatch repair (MMR) (Figure 8 et Figure 12).

a) *La réparation par excision de bases (BER)*

Elle est impliquée dans la réparation de bases modifiées. Il s'agit d'un mécanisme spécifique qui reconnaît une base endommagée par une oxydation, une méthylation ou une autre modification chimique survenue au cours des processus cellulaires. Ce système se déroule en plusieurs étapes : la première consiste à faire intervenir une ADN glycosylase spécifique à la base anormale qui va rompre la liaison N-glycosidique qui l'associe au désoxyribose, entraînant ainsi l'apparition d'un site abasique (Liu et al. 2007). Le brin d'ADN est ensuite clivé par une AP endonucléase permettant de former une extrémité 3'OH, indispensable à l'extension par l'ADN-polymérase β suivi d'une excision du site abasique. Une ADN-ligase intervient ensuite pour refermer le brin d'ADN (Figure 8).

b) *La réparation par excision de nucléotides (NER)*

Elle est impliquée dans la réparation d'adduits à l'ADN et de dimères de pyrimidine, lorsque les dommages de l'ADN sont importants et lorsqu'ils créent des blocages de la réplication et de la transcription (Nospikel 2009). Il existe deux voies de réparation : (i) celle couplée à la transcription qui concerne la réparation rapide des lésions situées sur le brin transcrit et affectant des gènes en cours de transcription (RCT), (ii) et la réparation globale du génome (RGG) qui concerne la réparation lente de l'ADN pour des gènes qui ne sont pas en cours de transcription (Hanawalt 2002). Ces deux voies ne diffèrent que par les processus de reconnaissance des dommages.

La réparation globale du génome (RGG) permet l'élimination des lésions induisant une distorsion de l'hélice de l'ADN dans la totalité du génome nucléaire de la cellule (Nospikel 2009). Cette voie s'effectue en plusieurs étapes. La première consiste à la recherche et la reconnaissance de la lésion par un complexe protéique (XPC /HR23B). Le complexe XPC /HR23B permet ensuite le recrutement du facteur de transcription TFIIH. La deuxième étape consiste à l'ouverture de la double hélice à l'aide d'hélicases (XPD et XPB) contenues dans le complexe TFIIH, en présence d'ATP. L'association d'autres protéines permet l'ancrage du complexe d'incision en 5' formé des protéines ERCC1/XP-F. Un fragment d'ADN est ensuite incisé (27 à 34 nucléotides). Enfin le brin est répliqué par

les ADN polymérase ϵ et δ , puis l'ADN est ligaturé par une ADN ligase (Hanawalt 2002; Magnaldo 2004).

La réparation couplée à la transcription (RCT) est une sous-voie de la NER. Les lésions du brin transcrit d'un gène actif sont réparées préférentiellement par RTC suivant l'arrêt de l'ARN polymérase II lors de la transcription. La première étape correspond donc au déplacement de l'ARN polymérase II bloquée sur la lésion par les protéines CSA et CSB. Les étapes suivantes sont identiques à celles du GGR (Figure 12).

Une déficience en protéines de réparation (famille XP couplé au facteur de transcription TFIIH) va conduire à des maladies de type : *xeroderma pigmentosum*, dont les malades présentent une forte sensibilité aux UV, accompagnée de nombreuses lésions cancéreuses (Magnaldo 2004).

c) *Le mismatch repair (MMR)*

Ce mécanisme est impliqué pour réparer les mésappariements, insertions et délétions de bases dues aux erreurs post-répliquatives faites par des ADN polymérase (Rass et al. 2011). Il peut également corriger les boucles d'ADN (Fleck and Nielsen 2004). Ce mécanisme a dans un premier temps été découvert chez *E. coli*. Les principales protéines procaryotes entrant en jeu s'appellent MutS, MutL et MutH. Chez l'Homme, leurs homologues qui interviennent sont les complexes MSH et MLH. À l'heure actuelle, aucun homologue de MutH n'a été identifié. L'hétérodimère MSH2/MSH3 reconnaît les lésions touchant les insertions/délétions et les petites boucles, alors que l'hétérodimère MSH2/MSH6 reconnaît uniquement les mésappariements de bases (Figure 12).

Intervient ensuite l'hétérodimère MLH1-PMS2, puis EXOI pour exciser les nucléotides autour de la lésion. Le brin est ensuite répliqué par l'ADN polymérase δ , puis l'ADN est ligaturé par l'ADN ligase I (Figure 12).

Une déficience en protéines de réparation (MSH2, MSH3, MSH6, MLH1 et PSM2) est associée à une prédisposition aux cancers colorectaux et de l'endomètre (Jackson and Bartek 2009).

2. Réparation des CDB

Les CDB, induites par les radiations ionisantes ou des produits chimiques, correspondent aux dommages de l'ADN les plus délétères pour l'organisme (Mah et al. 2010a), ceci à cause des difficultés associées à leurs réparations, en raison du manque de brin intact qui permettrait une réparation fidèle. D'autre part, ces cassures perturbent la continuité de la molécule d'ADN ce qui peut entraîner une perte importante de l'information génétique, (Lieber et al. 2006; Scott and Pandita 2006). En conséquence, les CDB constituent une menace à l'intégrité génomique et à la survie cellulaire.

Deux mécanismes de réparation sont mis en jeu dans la réparation des CDB : la réparation homologue (HR) et le processus de jonction d'extrémités non homologues (NHEJ) (Mah et al. 2010b; Tomita 2010). La HR utilise la chromatide sœur, modèle homologue, tandis que le NHEJ rejoint les extrémités cassées de l'ADN sans utiliser de brin modèle et est souvent accompagné par la perte ou à l'addition d'un certain nombre de nucléotides. Le recours de l'une ou l'autre voie de réparation dépend des étapes du cycle cellulaire où ont lieu les CDB : la NHEJ a lieu en durant tout le cycle cellulaire, alors que la HR est utilisée durant les phases S et G2 (Fleck and Nielsen 2004).

a) *Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM)*

Quel que soit le mécanisme de réparation des CDB utilisé, les premières étapes sont identiques : dès les premières minutes qui suivent une CDB d'ADN, le complexe protéique MRN (MRE11–RAD50–NBS1) se fixe sur la lésion et stabilise l'ADN aux extrémités du site du dommage (Figure 12) (Jackson and Bartek 2009; Rass et al. 2011; Smith et al. 2010). Ce complexe permet ensuite le recrutement d'ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*), une protéine kinase de la famille des PI3K (Phosphatidy Inositol-3 related Kinase) (Bonner et al. 2008). ATM est naturellement présente dans les cellules sous sa forme inactive (dimères ou multimères). Dans les cellules humaines, son activation se fait après monomérisation par une autophosphorylation sur la Ser 1981 (Yang et al. 2011a), étape indispensable pour la fixation à la lésion et l'activation de checkpoint (point de contrôle du cycle cellulaire) (Kastan and Bartek 2004). S'ensuit une cascade de signalisation aboutissant à l'arrêt du cycle cellulaire et au recrutement de facteurs impliqués dans la réparation de l'ADN.

b) H2AX

Suite à l'activation d'ATM, un des premiers facteurs qui intervient est l'histone H2AX. Il s'agit d'une isoforme de l'histone H2A, intervenant dans la formation des nucléosomes. Chaque nucléosome possède deux molécules d'H2A. En fonction du type cellulaire ou tissulaire étudié, H2AX représente 2 à 25 % du taux d'expression relatif de la protéine H2A, (Rogakou et al. 1998) et est distribuée de façon homogène sur la chromatine (par exemple : 10 % dans les fibroblastes humain, 2% dans les lymphocytes et 20 % dans la lignée cellulaire humaine SF268). Les raisons de cette disparité sont pour l'instant inconnues. Le gène codant pour cette protéine s'appelle *H2AFX* et est présent sur le chromosome 11 à la position 11q23 (Bassing et al. 2003; Bonner et al. 2008; Mah et al. 2010b). Cette protéine est hautement conservée dans l'évolution (Tableau 2) (Bonner et al. 2008).

Species	Core (C-terminal portion)	Linker	Tail
Human	NDEELNKLLGGVTIAQGGVLPNIQAVLLPCK	TSATVGPKAPSGGKKATQA	SQEY
Chimpanzee	NDEELNKLLGGVTIAQGGVLPNIQAVLLPCK	TSATVGPKAPSGGKKATQA	SQEY
Mouse	NDEELNKLLGGVTIAQGGVLPNIQAVLLPCK	SSATVGPKAPAVGKKASQA	SQEY
Chicken	NDEELNKLLGGVTIAQGGVLPNIQAVLLPCK	TGGGAASPAKAGKKGSQQ	SQEY
Zebrafish 1	NDEELNKLLGGVTIAQGGVLPNIQAVLLPCK	TGQAAAASSGKSGKKSSQ	SQEY
<i>Xenopus laevis</i>	NDEELNKLLGGVTIAQGGVLPNIQAVLLPCK	SSGGVSTSGKKSSQQ	SQEY
<i>Anopheles gambiae</i>	NDEELSKLLQGTTSQGGVMPNIHVSLLPRK	TGAKAAGNSSSQEKQ	SQFY
Zebrafish 2	NDEELNTLLGGVTISEGGVLPNIQAVLLPCK	TKAAREPNAGTEAQ	SQDF
Chickpea	NDEELSKLLGSVTIANGGVLPNIHQTLPPK	VGKKGKEIGSA	SQEF
<i>Tetrahymena pyriformis</i>	NDEELNKLMANTTIADGGVLPNINPMLPSK	SKKTESRGOA	SQDI
Budding yeast	NDEELNKLLGNVTIAQGGVLPNIHQNLLPCK	SAKATKA	SQEL
Fission yeast	NDEELNKLLGHVTIAQGGVVPNINAHLLPKT	SGRTGKP	SQEL
<i>Giardia intestinalis</i>	KDKELATIFANVTIREGGVARSAGEGREGKG	SHR	SQDL

Tableau 2 : Séquences d'ADN d'H2AX de différentes espèces (d'après Bonner et al., 2008)

Après la lésion de l'ADN, la double hélice d'ADN se décondense (Huang et al. 2006b) laissant alors la protéine histone H2AX accessible. D'autres protéines kinases de la famille des PI3K telles qu'ATR (AT-Related), et la DNA protéine kinase (DNA-PKcs) ainsi que des protéines reconnaissant spécifiquement un motif SQE, peuvent également phosphoryler la sérine 139 de H2AX du côté C-Ter, de manière dose dépendante (Huang et al. 2006a; Rogakou et al. 2000). La forme phosphorylée de l'histone s'appelle alors γ -H2AX. Pour chaque CDB, plusieurs molécules d'histones seront phosphorylées jusqu'à 1 à 2 mégabases de part et d'autre de la cassure (Rogakou et al. 1998) formant ainsi des foci détectables en microscopie (Figure 13 et Figure 14). Cette propagation autour de la cassure est initiée par le complexe MRN/ATM (West and van Attikum 2006).

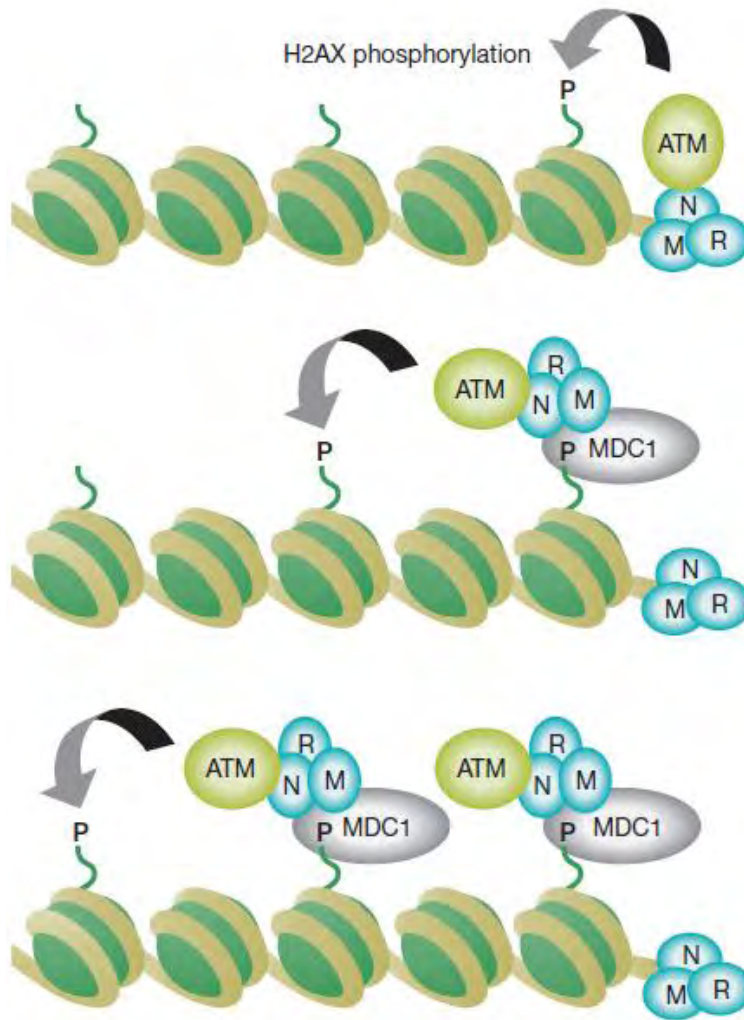


Figure 13 : Représentation schématique de la propagation de la phosphorylation de H2AX par MDC1 suite aux CDB d'ADN (West and van Attikum 2006).

Le recrutement de complexes protéiques MRN et ATM aux extrémités libres de l'ADN permettent l'initiation de la phosphorylation d'H2AX. La fixation de la protéine MDC1 (Mediator of DNA damage Checkpoint), sur la forme phosphorylée active le complexe MRN et ATM qui initie la propagation de la phosphorylation d'H2AX.

La phosphorylation d'H2AX est une étape clef qui permet le recrutement de nombreuses molécules sur le site de la cassure (Zhou et al. 2006), notamment les checkpoints du cycle cellulaire (paragraphe C) (Figure 14). Il est également le précurseur de nombreuses cascades de signalisation cellulaire donnant lieu par exemple au processus d'apoptose, entre autre par la voie p38 MAPK (Hsiao et al. 2007; Yuan et al. 2010).

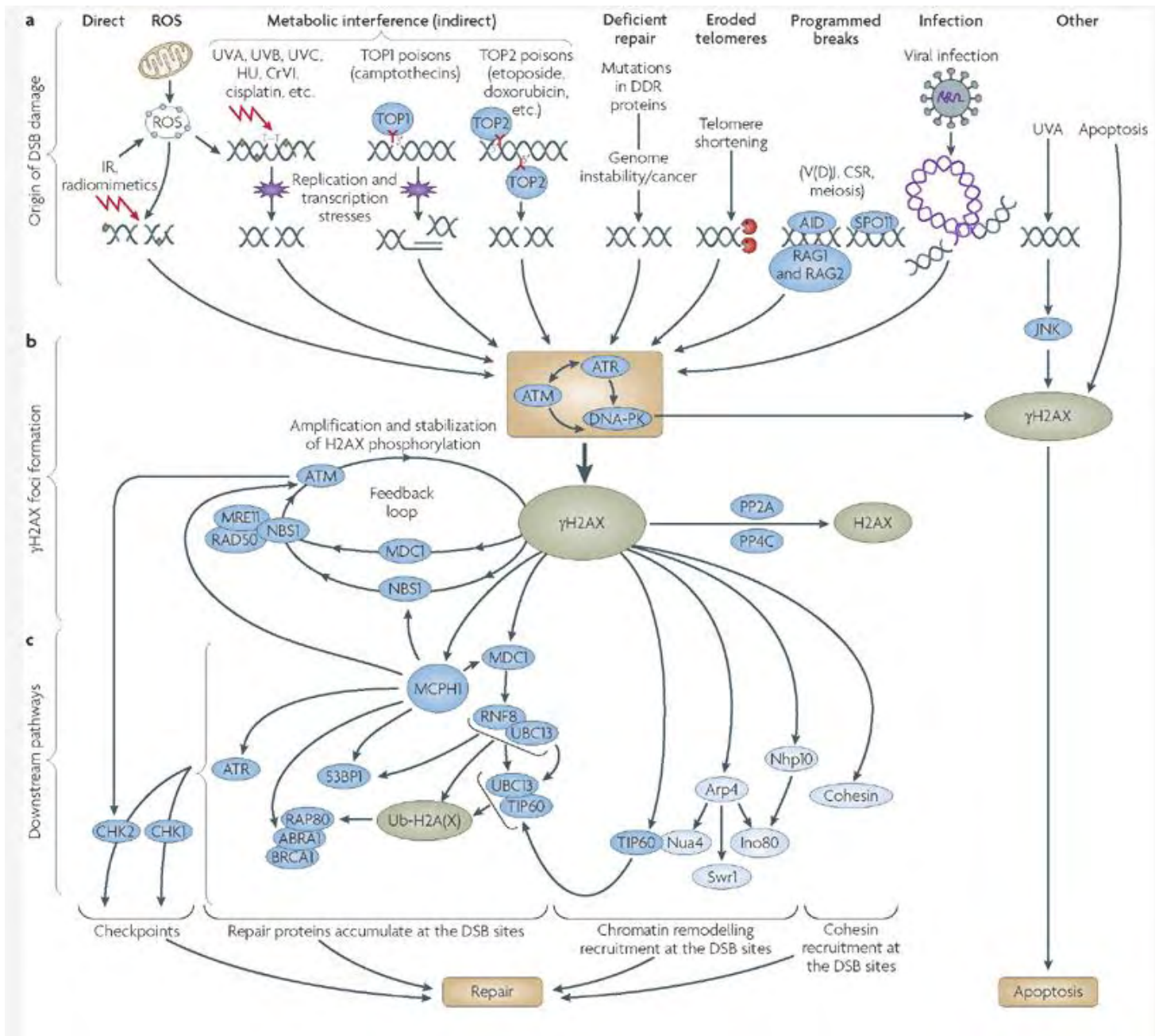


Figure 14 : Activation d’H2AX suite aux CDB d’ADN (d’après Bonner et al, 2008).

H2AX est une protéine clef, rapidement phosphorylée par ATM/ATR et DNA PKs kinase, qui est le précurseur de nombreuses voies de signalisation cellulaires. (A) Origine des CDB. (B) Activation d’H2AX. (C) Différentes voies de signalisation cellulaires aboutissant aux mécanismes de réparation de l’ADN.

Une fois les CDB réparées, des phosphatases (PP2A, PP4, PP6 et Wip1) vont inactiver les foci de γ -H2AX par déphosphorylation (Bonner et al. 2008; Macurek et al. 2010; Nakada et al. 2008; Sedelnikova et al. 2010).

Bien que protéine clef dans la signalisation cellulaire, H2AX n'est pas une protéine indispensable à la survie cellulaire. Les cellules H2AX-déficientes montrent seulement quelques défauts dans les points de contrôle des dommages et la réparation de l'ADN mais qui a toujours lieu, même en absence d'H2AX (Yuan et al. 2010). En effet, dans le cas où H2AX est déficient, un recrutement de facteurs de réparation est toujours observé (Celeste et al. 2003). En revanche, une absence d'H2AX est associée à une déficience immunitaire, une instabilité génomique et une prédisposition aux cancers (Celeste et al. 2002; Srivastava et al. 2009).

c) La recombinaison homologue (HR)

Lorsque les cassures ont lieu durant les phases S et G2, la cellule va préférentiellement utiliser la recombinaison homologue pour les réparer, en utilisant la chromatide sœur présente et encore intacte (Fleck and Nielsen 2004; Lieber 2010). Il s'agit d'un processus basé sur un échange d'information génétique nécessitant une longue séquence d'homologie grâce à une recombinaison entre deux séquences d'ADN dont l'une est porteuse de dommages. Une fois la cassure détectée par le complexe MRN, une résection par des protéines de types nucléase et hélicase est effectuée (CtIP, EXO1) (Branzei and Foiani 2008). La protéine RPA se fixe ensuite sur l'ADN simple brin pour le protéger et pour faciliter avec Rad52, la formation du filament de Rad51. Rad51, en association avec ses paralogues et Rad54, initie la recherche de séquences homologues au niveau de la chromatide sœur. Une structure particulière va ensuite être créée entre les deux chromatides : la jonction de Holliday qui va conduire à la fusion avec l'hélice intacte et permettre l'échange de brins (Figure 8) (Yuan et al. 2010). L'extrémité 3' libre s'hybride ensuite au niveau de la matrice ADN et une ADN polymérase synthétise le nouveau brin. La jonction de Holliday est résolue et le brin néosynthétisé est ligaturé par une ADN ligase.

La HR est un processus de réparation qui est qualifié de réparation fidèle ou « error-free » (Fleck and Nielsen 2004) car elle permet la restauration de la séquence sans perte d'information génétique, en revanche, l'étape de résection peut constituer un risque d'instabilité génétique.

d) La recombinaison non homologue (NHEJ)

Dans les cellules humaines, la réparation des CDB se fait majoritairement par NHEJ, car contrairement à la RH, elle ne nécessite pas de séquence d'homologie pour effectuer la réparation, ce qui lui permet d'être présente dans tout le cycle cellulaire (Lieber 2010). Cette réparation peut aboutir au niveau de la cassure de l'ADN, à la délétion ou l'insertion de nucléotides car le principe repose sur la jonction des extrémités lésées. Le gène ainsi réparé par ce mécanisme n'est plus fonctionnel. Les protéines qui interviennent sont la sous-unité catalytique d'DNA-PKcs, ses sous-unités régulatrices Ku70 et Ku80, Artemis et la ligase IV/XRCC4/XLF (Rass et al. 2011; Suzuki et al. 2009). Deux mécanismes ont été identifiés : l'un est dit classique (C-NHEJ) et l'autre est qualifié d'alternatif (B-NHEJ) pour Backup NHEJ. Le mécanisme présenté ici est celui du C-NHEJ. L'initiation se fait par la liaison des dimères Ku70/Ku80 aux extrémités des cassures de l'ADN. Le complexe KU permet ensuite le recrutement de la sous-unité catalytique DNA-PKcs pour former le complexe DNA-PK (DNA dependant-Protein Kinase). Après phosphorylation de ce complexe, le recrutement du complexe XRCC4/ADN ligase IV aidé par Cernunnos/XL-F peut avoir lieu (Rass et al. 2011). Une préparation des extrémités par la protéine Artémis et l'intervention de polymérases peuvent être nécessaires avant l'étape de ligature par l'ADN ligase IV/XRCC4 (Figure 15 B).

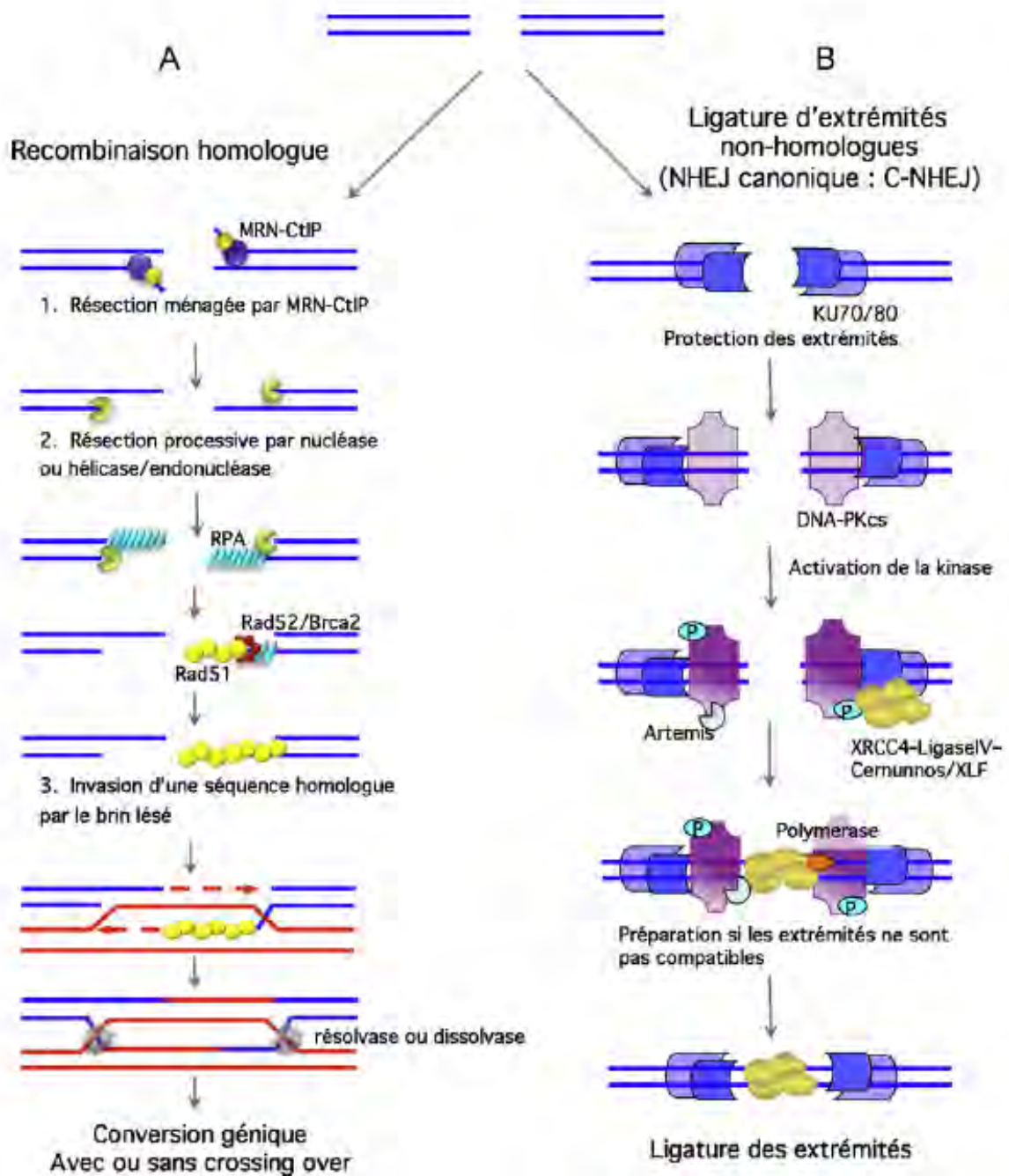


Figure 15 : Mécanismes de réparation des cassures double brin d'ADN (d'après Rass et al., 2011).

La réparation homologue (A), utilisée durant les phases S et G2 du cycle cellulaire, utilise la chromatide sœur encore intacte pour réparer la partie déficiente. Le complexe protéique MRN détecte la cassure, puis une résection par CtIP, EXO1 est effectuée. Les protéines RPA et Rad52 se fixent ensuite sur l'ADN simple brin puis Rad51 en association avec ses paralogues et Rad54, initie la recherche de séquences homologues au niveau de la chromatide sœur. Une ADN polymérase synthétise ensuite le nouveau brin. La réparation non homologue (B) est effectuée par les protéines catalytiques Ku70 et Ku80, Artemis et la ligase IV/XRCC4/XLF.

Les CDB sont aussi impliquées dans l'initiation d'amplification de gènes, qui peut aboutir aux déséquilibres des facteurs critiques pour maintenir l'homéostasie cellulaire. De plus, l'activation d'oncogènes par la translocation ou l'amplification est un mécanisme prédominant pour la transformation cellulaire et tumorigène (Bassing et al. 2003).

L'analyse de cellules déficientes en protéines de réparation des CDB a révélé une forte rédisposition aux translocations, aux instabilités chromosomiques caractérisées par un réarrangement et une perte de chromosomes (aneuploidy), et une perte de l'hétérozygotie (LOH : loss of heterozygosity) (Tableau 3). De nombreux symptômes y sont associés chez l'Homme tels que Ataxia telangiectasia (ATM-ATR), et des troubles liés, le syndrome de Nimègue (Nijmegen breakage syndrome : NBS), des cancers du sein et des ovaires (mutation de BRCA1 et BRCA2) (Jackson and Bartek 2009; Kastan and Bartek 2004). Ces défauts de réparations sont particulièrement observés après exposition à des agents induisant ces cassures (O'Driscoll and Jeggo 2006).

Syndrome	Gene	Processes affected	Nature of mutation	Immunological phenotype	Developmental phenotype	Cancer phenotype	Other phenotypes
LIG4 syndrome	LIG4	NHEJ; V(D)J recombination; CSR	Hypomorphic	Pancytopenia or combined immune deficiency	Developmental and growth delay; microcephaly; 'Seckel-like' facial features	Lymphoid tumours (in 2 out of 6 patients studied)	Psoriasis; photosensitivity; type II diabetes; atypical bone maturation
RS-SCID	Artemis	ATM-dependent NHEJ; V(D)J recombination	Null	Severe combined immunodeficiency	Normal	Not reported	Absence of tonsils and lymph nodes
			Hypomorphic	Partial T- and B-cell lymphocyte deficiency	Omenn syndrome in one patient	EBV-associated lymphomas	Not reported
AT	ATM	ATM signalling; ATM-dependent NHEJ	Null and hypomorphic	Impaired lymphocyte proliferation; rearrangements of IgG and T-cell receptor genes; reduced IgA and IgG4; agammaglobulinaemia*	Progressive ataxia; oculocutaneous ³ telangiectasias	Tumours of lymphoid origin (non-Hodgkins B-cell lymphomas); T-cell leukaemias	Ocular apraxia; dysarthria ³
ATLD	MRE11	ATM signalling; ATM-dependent NHEJ	Hypomorphic	Mild AT	Mild AT	None reported	Ocular apraxia; dysarthria
NBS	NBS1	ATM signalling; ATM-dependent NHEJ and possibly ATR signalling	Hypomorphic	Similar to AT	'Seckel-like' facial features; growth retardation; microcephaly	Tumours of lymphoid origin (B-cell lymphomas, also leukaemias)	Structural brain abnormalities (pachygyria)
ATR-Seckel syndrome	ATR	ATR signalling	Hypomorphic	Normal	Proportionate dwarfism; developmental delay; marked microcephaly	None reported	Dental malocclusion; thoracic kyphosis; ivory epiphysis ³ of the hands
FANCD1	BRCA2 (FANCD1); other FANC genes (FANCA, B, C, D2, E, F, G, J, L)	Fanconi anaemia pathway; homologous recombination	Hypomorphic	Aplastic anaemia; myelodysplastic syndrome	Thumb and radial abnormalities (hypoplasia, absence); gastrointestinal problems (oesophageal atresia)	Acute myeloid leukaemia; head and neck squamous cell carcinoma	Microcephaly; short stature

Tableau 3 : Maladies associées aux défauts de réparation et gènes affectés (d'après O'Driscoll et al., 2006)

C. Contrôle du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est l'ensemble des phases par lesquelles passe une cellule entre deux divisions cellulaires. Il est divisé en quatre phases distinctes : La phase M qui est la mitose, pendant laquelle la cellule se divise. Intervient ensuite la phase G₁, qui est la phase de croissance de la cellule, puis vient la phase S, qui correspond à la duplication de l'ADN. La phase G₂ intervient entre la phase S et M. La cellule se prépare alors à entrer en mitose et synthétise les protéines de communication cellulaire. Elle contrôle également la réplication de l'ADN et répare d'éventuels dommages (Figure 16).

Afin de permettre aux cellules de réparer les dommages de l'ADN, le cycle cellulaire est arrêté à la suite d'un stress. Les points de contrôles (checkpoints) activés par les dommages de l'ADN ont été partiellement identifiés. Ils sont situés avant que la cellule n'entre en phase S (G₁-S checkpoint), pendant la phase S, une fois la réplication de l'ADN terminée (G₂-M checkpoint) ou au cours de la mitose (métaphase/anaphase checkpoint) (Harper and Elledge 2007).

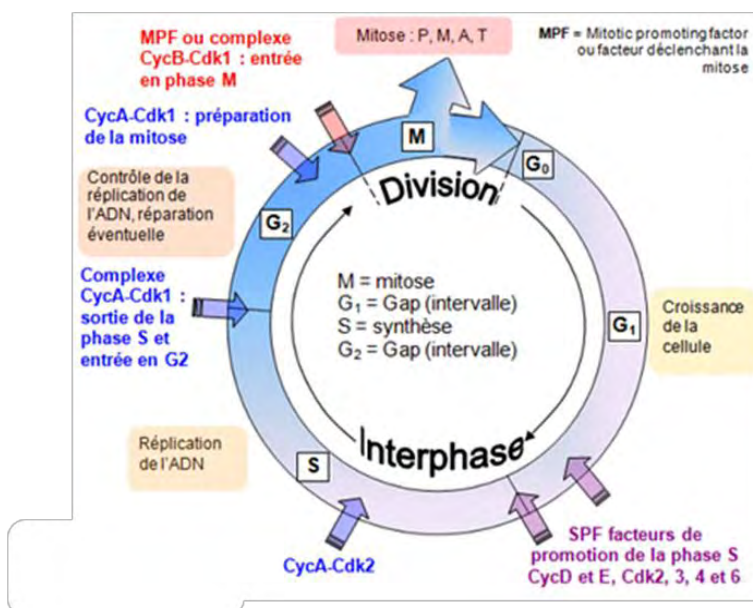


Figure 16 : Représentation du cycle cellulaire d'après Dolisi. Les principaux points de contrôles intervenant durant le cycle y sont représentés.

(<http://www.medicalorama.com/encyclopedie/11161>)

Les mécanismes impliqués dans le point de contrôle G₂-M sont moins connus que ceux du point de contrôle G₁/S. Le complexe cdc2/cyclin B agit comme un régulateur d'entrée dans la mitose. La cellule ne peut se diviser qu'après action d'une phosphatase, cdc25C, sur ce complexe (Branzei and Foiani 2008; Harper and Elledge 2007). Suite aux lésions à l'ADN, une cascade de signalisation est activée pour éviter à cdc25 d'activer le complexe cdc2/cyclin B et maintenir l'inhibition de la mitose (Stark and Taylor 2006). Après phosphorylation de l'histone H2AX, ATM et ATR, les médiateurs centraux de la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN, vont activer respectivement les protéines

kinases Chk2 et Chk1 (Roos and Kaina 2006) et maintenir l'inhibition de la mitose par CDK1 (Figure 17).

Suite à un endommagement de l'ADN, CHK1 et CHK2 ne sont pas les seules kinases capables de phosphoryler CDC25. En réponse aux stimuli de stress (choc osmotique, chaleur, action des UV, cytokines), SAPK/JNK et p38 sont directement activés. Cette activation contribue au contrôle du point de contrôle G2/M par l'activation de p53 (Stark and Taylor 2006).

Le mécanisme impliqué au point de contrôle G1-S est sous la dépendance du système p53, qui empêche la réplication de l'ADN endommagé. Comme pour le point de contrôle G2-M, l'entrée en phase S est soumise à des protéines régulatrices de type kinases cycline-dépendantes, appelées Cdk2, Cdk4 et Cdk6, qui comme Cdk1, ne sont actives que lorsqu'elles sont couplées à une cycline (cycline D pour Cdk4 et Cdk6 et cycline E pour Cdk2) (Schmitt et al. 2007). La phosphorylation de p53 par ATM et ATR après reconnaissance des lésions de l'ADN, a pour conséquence une surexpression de la protéine suppresseur de tumeur p21 Waf1/Cip1 (Kastan and Bartek 2004; Levine 1997) ; p21 qui est une CKI (*cycline-dependent kinase inhibitors proteins*) inhibe alors l'action des Cdk en

empêchant la formation du sous-ensemble et ainsi stoppe la cellule en phase G1. Si la cellule est trop endommagée, le suppresseur de tumeur p53 déclenche une cascade de signalisation cellulaire qui oriente alors la cellule vers le processus d'apoptose (Wang and Prives 1995) .

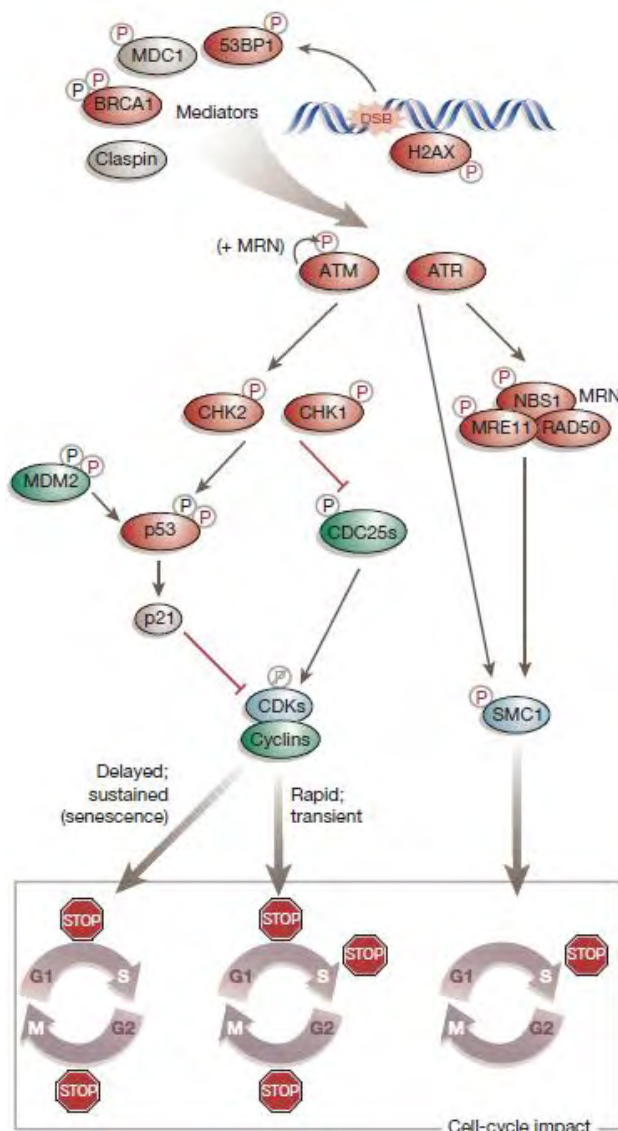


Figure 17 : Représentation schématique de la signalisation cellulaire après induction de CDB d'ADN (d'après Kastan et Bartek, 2004). Après les CDB, ATM et ATR vont phosphoryler directement CHK1/CHK2 et le complexe MRN. S'ensuit une cascade de signalisation cellulaire qui aboutit soit à un arrêt du cycle en phase G1/S, ou G2/M, soit à un enclenchement du processus d'apoptose par la voie de p53.

Enfin au cours de la mitose, et plus particulièrement durant la prométaphase et la métaphase un mécanisme de contrôle opère pour s'assurer que tous les chromosomes sont correctement attachés au fuseau avant que la séparation des chromatides-sœurs n'ait lieu. Celle-ci reste bloquée tant qu'il reste au moins un kinétochore non associé au fuseau. Suite à l'éclatement de la membrane nucléaire, les protéines du checkpoint sont recrutées à la surface des kinétochores des chromosomes non attachés (Hagan et al. 2011). Les protéines qui interviennent sont Bub1, Bub3, Mad1, Mad2, Msp1. Ils forment un complexe inhibiteur de cdc20, qui, normalement, interagit avec APC pour diriger sa spécificité de substrat pour la sécurine. Au final, Cdc20 ne peut pas activer l'APC/C, la sécurine n'est pas ubiquitinylée et la séparase reste donc inactive : la transition vers l'anaphase et la ségrégation des chromosomes sont retardées (Musacchio and Salmon 2007).

D. Méthodes de détection de la génotoxicité

De nombreuses molécules chimiques cancérigènes sont également mutagènes. Plusieurs tests de génotoxicité ont été développés comme alternatives au test de cancérogenèse classique qui est contraignant par ses coûts, sa durée (2 ans) et par l'utilisation d'animaux (EFSA 2011c). Ces tests sont utilisés pour effectuer un criblage rapide du potentiel génotoxique des xénobiotiques, données nécessaires à l'évaluation des risques. Il existe de nombreux tests réglementaires qui suivent les lignes directrices de l'OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Economique) dont le but est d'uniformiser les méthodologies mises en œuvres par les laboratoires. Il est impossible d'obtenir un test unique capable de détecter tous les types de dommages cités précédemment. Dans l'évaluation des risques de substances génotoxiques, il est alors recommandé d'utiliser une batterie de tests *in vitro* et *in vivo*, qui comprend les principales altérations de l'ADN, tels que des tests de mutation génique, des tests d'aberration chromosomique ainsi que des tests observant des lésions primaires de l'ADN (Eastmond et al. 2009; EFSA 2011b; Kirkland et al. 2007; Thybaud et al. 2007). Pour tenir compte des composés génotoxiques actifs après métabolisation, il est également recommandé d'effectuer ces tests en présence ou non de fractions subcellulaires contenant les principales enzymes du métabolisme (S9) (EFSA 2011b). Dans ce paragraphe, sont principalement décrits les tests de génotoxicité recommandés lors de l'homologation des pesticides (Directive 91/414/CE).

1. Mutation génique

a) Mutation génique sur cellules procaryotes

Il s'agit d'un des premiers tests *in vitro*, mis au point par le Pr. Bruce Ames (1973), utilisant des cellules procaryotes mutantes (*Salmonella thyphimurium*), qui fait l'objet d'une ligne directrice de l'OCDE (n°471). Il a été ensuite développé avec une autre souche bactérienne : *Escherichia coli*. Le principe du test est de mettre en présence des substances potentiellement mutagènes avec des souches procaryotes, qui sont auxotrophes vis-à-vis d'un acide aminé (histidine pour *Salmonella thyphimurium* et tryptophane pour *Escherichia coli*). Dans le cas de *Salmonella thyphimurium*, la mutation porte sur le gène qui gouverne la synthèse de l'histidine. Si l'agent est mutagène il sera capable de provoquer des mutations dites reverses ; c'est-à-dire que les bactéries auxotrophes deviendront prototrophes, donc capables de croître dans un milieu sélectif dépourvu d'histidine (Ames et al. 1973). Le modèle utilisé lui confère à la fois des avantages (croissance et effet observable rapidement) et des inconvénients (doses toxiques difficiles à extrapoler à l'Homme en raison des différences cellulaires, de l'absence d'enzyme du métabolisme qui rend nécessaire l'ajout de S9 humain ou murin, et à la présence d'une paroi). Différents types de mutations peuvent être observés : des mutations ponctuelles (transitions et transversions) avec les souches TA 100, TA 1537, TA 102 et la souche *E coli* WP2 *uvra* pKM101, des mutations par décalage du cadre de lecture (frameshifts avec les souches TA 97, TA98, TA1537). Le test d'Ames est adapté à diverses substances : liquides, solides, gazeuses. En revanche, de nombreuses molécules ne peuvent être testées, telles que les composés bactéricides comme les antibiotiques par exemple (Gatehouse et al. 1994). Ce test est recommandé dans la batterie de tests lors d'une évaluation des risques d'une substance ainsi que pour l'évaluation de la génotoxicité des pesticides (directive 91/414/CE).

b) Mutation génique sur cellules de mammifère : test HGPRT (Forward Mutation Assay) ou TK

Les tests de mutations géniques permettent de mettre en évidence des mutations viables, ce qui en fait leur intérêt majeur car ce type de mutations joue un rôle prépondérant dans le processus de cancérogenèse (Mitchell et al. 1997). La recherche de mutation génique peut également se faire sur des cellules de mammifères (lymphome de souris L5178Y, lignées CHO, AS52 et V79 de cellules de hamster chinois et TK6 de cellules humaines lymphoblastoïdes). Ce test *in vitro* fait également l'objet d'une ligne directrice de l'OCDE (n°476), qui est actuellement en cours de révision. Il permet de

détecter des mutations sur les loci de la thymidine kinase (TK), ou de l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT) (Albertini et al. 2000). Des cellules possédant la TK sont sensibles à la trifluorothymidine (TFT), un analogue de la pyrimidine, qui entraîne une inhibition du métabolisme et la mort cellulaire. Le principe repose sur le fait que les cellules devenues déficientes en TK, suite à une mutation, sont résistantes aux effets cytotoxiques de la TFT. Ainsi, des cellules mutantes peuvent proliférer en présence de TFT, tandis que les cellules normales qui possèdent une TK fonctionnelle ne le peuvent pas. De la même façon, des cellules déficientes en HGPRT sont sélectionnées par leur résistance à la 6-thioguanine (Albertini et al. 2000). Ce test fait partie de la batterie de test recommandé pour l'évaluation de la génotoxicité des substances actives.

c) *Test Pig-a*

Ce test *in vivo* est apparu il y a quelques années et permet d'observer des mutations cellulaires somatiques du gène codant pour la synthèse de glycosylphosphatidyl inositol (GPI). Le gène *Pig-a* qui est présent dans le chromosome-X (à la position 22.1), code pour une sous-unité catalytique du complexe de la N-acetylglucosamine transférase, qui est impliqué dans la synthèse de l'ancre glycosylphosphatidyl inositol (GPI) (Takahashi et al. 1993). Une mutation du gène *Pig-a* rend les cellules déficientes en GPI et elles ne possèdent alors plus de protéine d'ancrage de surface (Hu et al. 2005). Une seule mutation localisée sur le chromosome-X, peut inactiver la fonction enzymatique de la protéine de *Pig-a* et perturber la synthèse d'ancrage. Ainsi, le phénotype déficient d'ancrage GPI semble être équivalent à la mutation de *Pig-a*. Alors que les érythrocytes normaux exprimeront à leur surface membranaire les protéines d'ancrage du type CD49, CD45, CD235, les cellules mutées n'exprimeront pas à leurs surfaces CD49 (Figure 18). De même, les leucocytes normaux auront à leur surface les CD45 et CD48, alors que les mutés ne posséderont pas CD48.

La détection des mutations est réalisée par cytométrie de flux, en ajoutant à l'échantillon différents anticorps dirigés spécifiquement contre les protéines d'ancrages. Ainsi, les cellules non mutantes seront par exemple marquées par les anticorps anti-CD49 et anti-CD45, alors que les cellules déficientes seront marquées uniquement par les anticorps anti-CD45. Ce test *in vivo* est sensible, reproductible et ne demande pas beaucoup de matériel biologique (Dertinger et al. 2011). Il a été décrit sur des réticulocytes et érythrocytes de rat et de souris, des érythrocytes de singe et des granulocytes humains (Araten et al. 1999; Dobrovolsky et al. 2009; Kimoto et al. 2011; Miura et al. 2008a; Miura et al. 2008b; Miura et al. 2011). Il semble être un bon marqueur biologique d'exposition, il peut être utilisé pour faire du biomonitoring (Boschetti et al. 2004; Dobrovolsky et al.

2011) et est recommandé comme test supplémentaire pour l'évaluation du risque (EFSA 2011c; Thybaud et al. 2007).

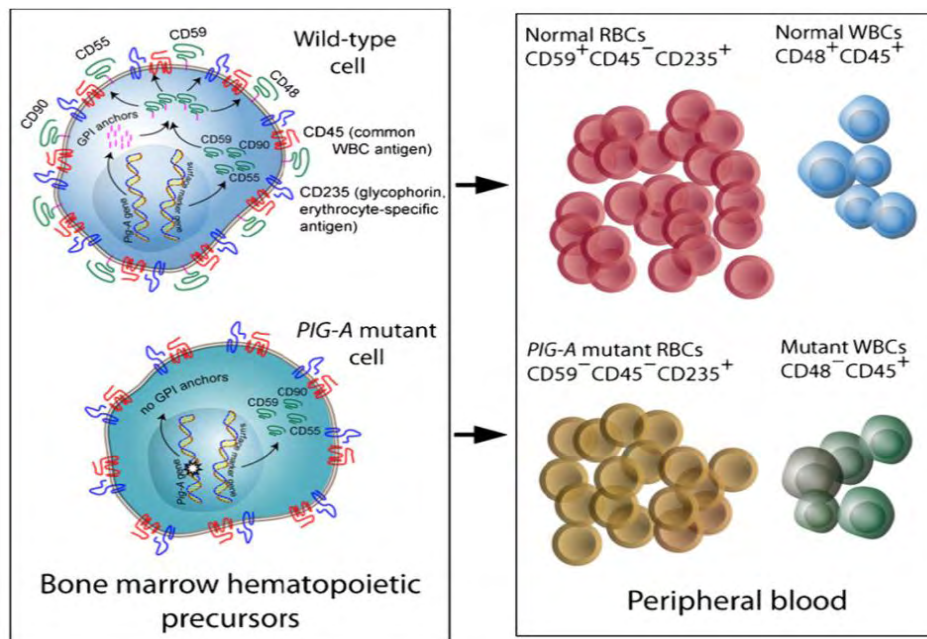


Figure 18 : Principe du test Pig-a (d'après Dobrovolsky et al., 2009)

2. Test détectant les cassures et/ou les changements du nombre de chromosomes : test des micronoyaux de souris.

Le test du micronoyau a pour but de détecter des substances qui engendrent la perte d'un fragment de chromosome ou des chromosomes entiers retrouvés sous la forme d'un micronoyau (Iarmarcovai et al. 2007). Il est pratiqué *in vivo* ou *in vitro* chez les mammifères ou cellules de mammifères et font l'objet de lignes directrices de l'OCDE (n°474 et 487), toutes deux en cours de révision. Il détecte les lésions des chromosomes ou de l'appareil mitotique d'érythroblastes résultant de l'action d'une substance d'essai.

In vivo, il est basé sur l'analyse d'érythrocytes prélevés dans la moelle osseuse et/ou dans les cellules du sang périphérique d'animaux, généralement des rongeurs, ou chez l'Homme. Les cellules ainsi collectées sont colorées (acridine orange ou Giemsa), puis analysées en microscopie pour observer la présence de micronoyaux. Il peut également être effectué à partir de prélèvements de foie, côlon, rate...

In vitro, il consiste à mettre en évidence d'éventuels micronoyaux (MN) dans le cytoplasme de cellules en interphase. Les micronoyaux peuvent avoir pour origine des fragments de chromosomes acentriques (c'est-à-dire dépourvus de centromère) ou des chromosomes entiers incapables de migrer vers les pôles de la cellule au cours de l'anaphase. L'essai permet de détecter l'activité de substances chimiques clastogènes et aneugènes dans des cellules ayant effectué une mitose pendant ou après l'exposition à la substance d'essai (Albertini et al. 2000). Une adjonction de cytochalasine B

avant la mitose ciblée permet la détermination et l'analyse sélective de la fréquence des micronoyaux dans les cellules ayant effectué une mitose, ces cellules étant binucléées.

L'avantage de ce test est qu'il peut s'utiliser sur tout type cellulaire. D'autre part, il s'agit du seul test qui détecte à la fois les mutations chromosomiques de nombre (aneugènes) et de structure (clastogènes), sans présenter les inconvénients de l'analyse des aberrations chromosomiques (voir 4b).

Le test du micronoyau est recommandé dans la batterie de tests pour l'évaluation génotoxique d'une substance (EFSA 2011c; Kirkland et al. 2005) et est utilisé dans l'évaluation des pesticides (directive 91/414/CE). Par ailleurs, il est souvent utilisé comme marqueur d'exposition aux xénobiotiques (Bolognesi et al. 2011; Mondal et al. 2011).

3. Autre test : mesure de la synthèse non programmée de l'ADN ou UDS (unscheduled DNA synthesis)

La mesure de la synthèse non programmée de l'ADN ou UDS (unscheduled DNA synthesis) est un test de mutagenèse qui fait l'objet d'une ligne directrice de l'OCDE (n°482), mais qui du fait de son manque de sensibilité et parce qu'il induit de nombreux faux positifs (EFSA 2011b) a été récemment archivé. Le principe est néanmoins décrit brièvement car il était précédemment recommandé lors de l'évaluation des pesticides. Il s'agit d'un test applicable *in vivo* (Ashby et al. 1985) et *in vitro* sur des cellules primaires ou sur des lignées cellulaires (Severin et al. 2005). Il permet de mesurer l'incorporation d'un nucléotide marqué, souvent la thymidine tritiée, dans l'ADN des cellules ne se trouvant pas en phase S du cycle cellulaire, durant les processus d'excision-resynthèse, mécanisme de réparation majoritaire dans les cellules. Le phénomène d'incorporation de thymidine tritiée peut se mesurer par deux méthodes. La technique autoradiographique permet de visualiser directement au microscope optique des grains d'argent contenus dans le noyau des cellules qui ont réparé leur ADN. La seconde technique est le comptage en scintillation liquide, qui est moins onéreuse, plus rapide (24 heures), et permet donc l'étude de nombreuses molécules. Cependant, son inconvénient majeur réside dans le fait qu'il faut bloquer la synthèse semi conservative de l'ADN pour ne pas qu'elle interfère avec la synthèse d'ADN liée au phénomène de réparation.

Outre son manque de sensibilité, ce test quantifie les lésions de l'ADN d'une manière globale, sans distinguer différents types de dommages. Il ne permet donc pas de déterminer le mode d'action d'une molécule génotoxique. Enfin, l'UDS ne détecte que les mécanismes de réparation qui impliquent une incorporation de nucléotides, c'est-à-dire une étape de resynthèse de l'ADN.

4. Test détectant les cassures de l'ADN

a) Test des comètes

Il s'agit d'une technique rapide, sensible et peu coûteuse, qui est applicable *in vivo* et *in vitro* à tous types cellulaires. Elle permet d'évaluer quantitativement les cassures simple et double brin de l'ADN et les sites alcali-labiles générés par les xénobiotiques au niveau de cellules individualisées. Ce test, également appelé single cell gel (SCG) assay ou microgel electrophoresis (MG), a été décrit pour la première fois en 1978 par Rydberg et Johanson, puis repris en 1984 par Östling et Johanson. Le principe repose sur la capacité de migration dans un gel d'électrophorèse de fragments d'ADN. Plus les fragments d'ADN seront nombreux et petits, plus ils migreront loin et formeront après coloration de l'ADN, une comète dont la taille peut être mesurée (Ostling and Johanson 1984). En 1993, Olive et Banath ont corrélé quantitativement la taille de la comète ainsi que la distribution de la fluorescence entre la tête et la queue avec la fréquence des cassures de l'ADN. De nombreux systèmes d'analyse d'images permettent d'avoir une large gamme de paramètres quantitatifs pour décrire les propriétés densitométriques et géométriques des comètes, paramètres non disponibles lors de l'analyse visuelle. Ce test est considéré par la communauté scientifique comme performant car il ne nécessite que très peu de cellules (entre 400 et 2000 cellules) et est assez sensible (Olive and Banath 1993; Singh et al. 1994).

Comme le test du micronoyau, il a trouvé de nombreuses applications dans les études de dommages à l'ADN et de réparation, dans le « biomonitoring » à partir de lymphocytes prélevés sur des individus (Atherton et al. 2009; Lebailly et al. 1998; Simoniello et al. 2010). En condition alcaline, la spécificité de ce test peut être augmentée en rajoutant des enzymes de réparation de types *fpG*, *Endo III*, *AlkA*, qui reconnaissent et éliminent les bases oxydées ou alkylées (Smith et al. 2006). Ces réactions produisent des sites abasiques qui sont transformés en cassures simple brin tout le long du test (Collins 2004). Le test des comètes qui a fait l'objet d'études inter laboratoires pour son harmonisation, n'est pour le moment toujours pas autorisé en réglementation mais fera prochainement l'objet d'une ligne directrice. Cependant, il est tout de même recommandé comme test de génotoxicité supplémentaire (EFSA 2011c), mais n'est pas utilisé lors de l'évaluation des substances actives.

b) Test d'aberration chromosomique

Le test d'aberration chromosomique est employé pour la recherche de composés chimiques induisant des aberrations structurales dans des cellules de moelle osseuse d'animaux, généralement des rongeurs (rats, souris et hamsters chinois) (Albertini et al. 2000). Il peut également être réalisé *in vitro* à partir de lignées cellulaires de mammifères. Les aberrations structurales peuvent être de deux types : chromosomiques ou chromatidiques. Des animaux sont exposés à la substance d'essai par gavage *via* une sonde gastrique ou par injection intrapéritonéale et sont sacrifiés à la fin du traitement. Avant le sacrifice, les animaux sont traités avec un inhibiteur de fuseau. Des préparations chromosomiques sont alors faites à partir des cellules de moelle et colorées. Les cellules en métaphase sont analysées pour mettre en évidence les aberrations chromosomiques. La réalisation de ce test demande une grande expérience pour la lecture et l'interprétation des aberrations chromosomiques, ce qui en fait un inconvénient. Ce test fait l'objet de plusieurs lignes directrice OCDE (n°473 et 475) qui sont actuellement révisées. Il est utilisé pour l'évaluation des substances actives.

c) H2AX

L'apparition de CDB d'ADN va induire une cascade de signalisation cellulaire donnant lieu à la phosphorylation de l'histone H2AX, nommée alors γ -H2AX (Voir III.B.2.b). Cette phosphorylation intervient à chaque fois qu'une CDB est produite, comme par exemple lors du réarrangement de classe V(D)J des immunoglobulines par le système immunitaire (Lieber et al. 2006), ou durant la méiose, mais aussi lors du processus d'apoptose. Les nombreuses CDB générées induisent alors γ -H2AX. Depuis quelques années, de nombreuses études utilisent la protéine γ -H2AX comme marqueur de génotoxicité. Son analyse se fait à l'aide d'anticorps dirigés spécifiquement contre la partie C-ter de la forme phosphorylée de l'histone H2AX (Audebert et al. 2010; Leopardi et al. 2010). Pour chaque CDB, plus d'une centaine de molécules d'histone sont phosphorylées de part et d'autre de la cassure, ce qui en fait un marqueur très sensible. Cette technique permet alors de quantifier de façon indirecte les CDB de l'ADN produites par des agents physiques ou chimiques. Cette détection peut se faire par cytométrie en flux, western blot ou bien par In Cell Western (Audebert et al. 2010; Redon et al. 2011; Smart et al. 2011; Tanaka et al. 2007).

La technique d'In Cell Western (ICW) est une technique d'immunofluorescence de haut débit applicable en microplaques 96 puits, pour détecter des protéines d'intérêt exprimées ou réprimées par la cellule (Audebert et al. 2011; Audebert et al. 2010; Graillot et al. 2012). Cette technique à faible coût, est sensible et reproductible. Le principe repose sur la détection d'une protéine d'intérêt à l'aide d'anticorps primaires dirigés spécifiquement contre cette protéine. L'ajout d'un deuxième anticorps dirigé spécifiquement contre le premier et couplé à un fluorochrome permet alors leurs quantifications, en mesurant la fluorescence de façon globale, à l'aide d'un imageur infrarouge Odyssey (Li-cor). L'intérêt de ce test en plus de sa spécificité et de sa sensibilité, est qu'il permet de visualiser à la fois la protéine d'intérêt, mais également d'observer en parallèle la viabilité cellulaire à l'aide d'un marqueur d'ADN (TO-PRO3). La technique d'ICW est décrite dans les articles 2 et 3. Cette technique a été mise au point au laboratoire pour détecter la présence de γ -H2AX qui permet alors d'observer et de quantifier les CDB d'ADN de façon indirecte.

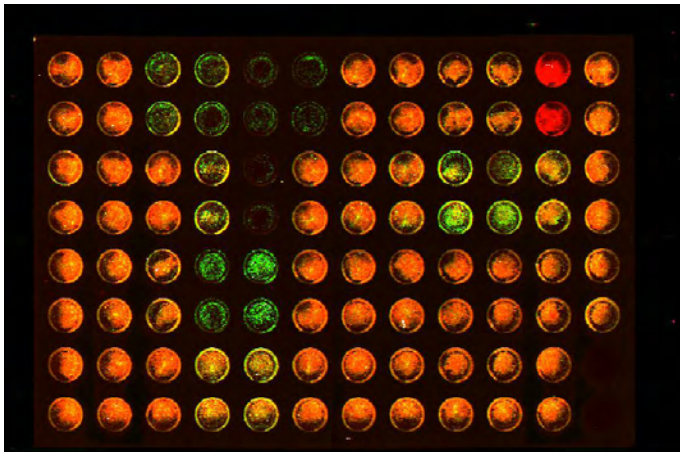


Figure 19 : Représentation d'une microplaque 96 puits analysée par la technique d'ICW.

Les cellules neuronales ont été ensemencées en plaque 96 puits, puis traitées pendant 24h à 5 différentes concentrations de mélange de pesticides. Les cassures double brin de l'ADN sont observées par immunofluorescence (test H2AX). L'ADN est coloré en rouge et γ -H2AX en vert.

Bien qu'à ce jour il ne soit pas intégré dans la batterie réglementaire de tests, cet essai offre de nombreux avantages, en particulier de pouvoir observer la cytotoxicité en parallèle de la génotoxicité à l'aide de la technique d'ICW, permettant ainsi de diminuer la variabilité entre les expériences due aux différentes réponses des cellules, mais également due aux erreurs potentielles du manipulateur. De plus, il est très sensible car il détecte de nombreux dommages conduisant au final à des CDB d'ADN initiées par exemple par les inhibiteurs de topoisomérase, les ERO, ou les adduits à l'ADN. Comparé aux autres tests de génotoxicité (Ames, micronoyaux), il a également montré une importante sensibilité et spécificité aux composés génotoxiques (Smart et al. 2011). Il a été observé que γ -H2AX était présent dans les cellules pré-cancéreuses (Bartkova et al. 2005; Gorgoulis et al. 2005) et dans les cellules sénescents (Mah et al. 2010a). De plus, il a été montré que la fréquence accrue d'une mauvaise ségrégation des chromosomes est associée à la présence de foyers d'H2AX (Janssen et al. 2011).

Chapitre II : **Problématique et objectifs**

L'exposition de la population générale à des mélanges de contaminants alimentaires qu'ils soient d'origine anthropique ou naturelle préoccupe les évaluateurs et les gestionnaires du risque en matière de santé publique. En effet, de nombreuses études montrent que la population générale est exposée à de nombreux contaminants alimentaires (études EAT1 et EAT2 par exemple (ANSES 2011a; Leblanc et al. 2004; Sirot et al. 2009b)). En ce qui concerne les pesticides, les programmes de surveillance constatent qu'un même aliment peut contenir des résidus de plusieurs pesticides. Dans un récent rapport, l'EFSA indique que des résidus de pesticides sont présents dans 39 % des échantillons analysés à travers l'Europe en 2009, dont 1,2 % seulement dépassent les LMR (EFSA 2011a). Dans 25,1 % des cas, plus de deux résidus sont retrouvés simultanément dans un même aliment, les principaux aliments contaminés étant les citrons, les raisins et les fraises. Ceci est dû au fait qu'une même culture peut recevoir, ensemble ou séparément, différents traitements phytosanitaires. Comparé aux précédentes années, ce pourcentage reste stable (augmentation de 15% en 1997 à 27% en 2008), (EFSA 2008c; EFSA 2010a; EFSA 2011a). Dans ces rapports, il est constaté que la population générale est exposée à de nombreux résidus de pesticides ayant la plupart du temps des mécanismes d'action différents (EFSA 2011a). L'évaluation du risque pour le consommateur est fondée sur l'étude toxicologique de ces substances considérées individuellement, conduisant à l'établissement de valeurs seuils pour chacune d'entre elles, sans prendre en compte l'existence possible d'effets combinés dus à la présence simultanée des résidus dans l'alimentation.

I. Evaluation du risque cumulé des pesticides

A. Interactions entre les constituants d'un mélange

L'exposition à des mélanges de composés induit parfois une réponse toxique significativement plus élevée ou plus faible que la simple somme des effets induits par les composants du mélange pris individuellement. Quatre différentes interactions entre les composés interviennent dans les mélanges (antagonistes, additifs, synergiques ou potentialisateurs). Un effet additif correspond à la somme des effets de chaque composé considéré individuellement. Deux approches différentes sont définies pour l'additivité: l'additivité de la réponse (« response addition ») et l'additivité de la dose (« concentration addition »). Ces deux concepts dépendent essentiellement des caractéristiques toxicocinétiques et toxicodynamiques des composants du mélange.

Un effet antagoniste correspond à une réponse biologique moindre lorsque deux ou plusieurs substances sont testées en mélange, par rapport à la somme des effets de chacun des constituants du mélange. Ce phénomène est par exemple celui observé pour les substances en compétition pour un même récepteur enzymatique ou hormonal (Olivero-Verbel et al. 2011). Dans le cas d'une

interaction synergique, l'effet combiné de deux ou plusieurs composés est supérieur à la somme des effets des composés pris individuellement. Enfin, la potentialisation traduit le fait qu'une substance dépourvue de toxicité puisse augmenter significativement la toxicité d'une autre substance.

Selon l'effet choisi, les interactions seront différentes. En ce qui concerne la génotoxicité, peu d'études existent sur les effets des composés en mélange par rapport aux composés seuls. La plupart des travaux réalisés consistent à évaluer les interactions entre un agent mutagène avec un co-mutagène ou un anti-mutagène (Isidori et al. 2009).

Il n'existe à ce jour aucun consensus au niveau international ou européen concernant l'évaluation des risques dus à des mélanges de substances (EFSA 2008c). Cependant, différentes stratégies existent pour évaluer les risques cumulés, qui sont basées sur le type de danger encouru et le mode d'action de la substance (Figure 20).

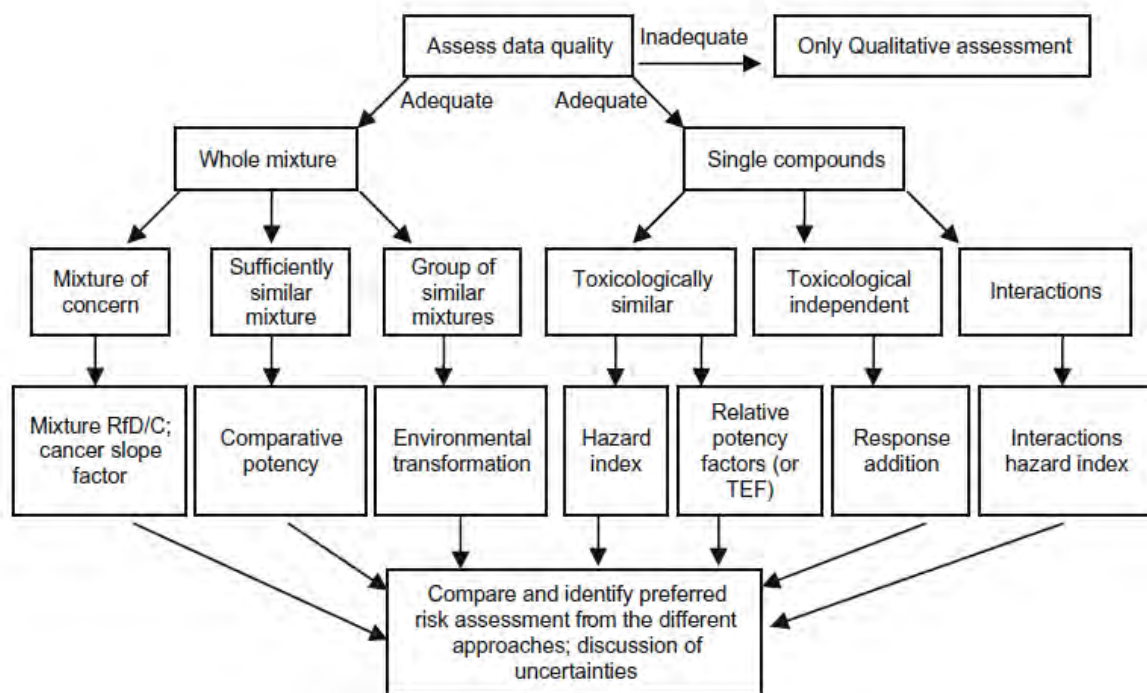


Figure 20 : Organigramme de l'approche d'évaluation de risque utilisée par US-EPA (d'après Refstrup et al., 2010)

B. Approches utilisées pour évaluer les substances ayant le même mode d'action

Le terme "même mode d'action" est souvent utilisé pour décrire les toxicités qui sont semblables. Il regroupe les substances causant le même effet critique, agissant sur la même cible moléculaire, selon le même mécanisme biochimique et pouvant partager un intermédiaire toxique commun. Parmi les pesticides, on peut citer le malathion, le fénitrothion, le pyrimicarbe, faisant partie de la famille des organophosphorés et des carbamates, dont le mode d'action commun est l'inhibition de l'acétylcholine esterase.

Des études portant sur l'évaluation du risque cumulé des résidus de pesticides dans les régimes alimentaires danois, hollandais, et brésilien ont été réalisées. Ces études portent soit sur des pesticides de la même famille, comme l'évaluation des dithiocarbamates au Brésil (Caldas et al. 2006b) soit, sur des pesticides présentant un même mode d'action comme les organophosphates et les carbamates (Boon et al. 2008; Caldas et al. 2006a; Jensen et al. 2003). Ces études débouchent ensuite sur la détermination de facteurs d'équivalence, permettant d'exprimer les différents résidus par rapport à une substance de référence. Cette méthode considère un effet additif des substances ayant le même mode d'action toxicologique, mais ne tient pas compte des possibles effets synergiques ou antagonistes du cocktail (Wilkinson et al. 2000). Or, le consommateur n'est jamais exposé qu'à un seul groupe de substances ayant un mode d'action commun, mais à des composés ayant une large variété de structures chimiques, agissant sur des cibles différentes et capables d'entraîner des effets physiopathologiques multiples. Ces études ne permettent donc pas de répondre au problème posé par une exposition à un mélange complexe, même si on le limite à une catégorie de substances telle que les pesticides. Pourtant, peu de travaux ont porté sur la caractérisation de l'effet combiné de pesticides en mélange, aux faibles doses (Gordon et al. 2006).

Les substances génotoxiques cancérogènes sont analysées avec l'approche des marges d'expositions. La MOE est utilisée pour déterminer un risque acceptable d'un produit chimique lorsque l'on ne dispose pas de valeur toxicologique de référence ou l'équivalent (EFSA 2005b; Wilkinson et al. 2000). La détermination repose sur les données toxicologiques humaines et animales. Lorsqu'elles sont > 10 ou > 100 les valeurs sont considérées comme acceptables (Reffstrup et al. 2010). Dans le cas d'un mélange, cette approche consiste à calculer la somme des valeurs de MOE de chaque composé, obtenue en divisant une valeur de référence (ex NOAEL) par l'exposition.

$$MOE_T = 1 / (1/MOE_1 + 1/MOE_2 + \dots 1/MOE_n)$$

Ainsi, une valeur de MOE_T est considérée comme acceptable si elle est supérieure à 100 (Reffstrup et al. 2010).

II. Effets des mélanges de pesticides chez l'homme

Malgré une espérance de vie plutôt supérieure à la moyenne, la mortalité et l'incidence de certaines maladies chez les agriculteurs sont en revanche supérieures par rapport à la population générale (ANSES 2011b). Ces conclusions reposent sur des études épidémiologiques qui identifient l'utilisation répétée de pesticides à fortes doses dans la survenue de pathologies neurodégénératives ou de cancers (Baldi and Lebailly 2007). Une corrélation entre l'exposition aux pesticides et la maladie de Parkinson (Moisan et al. 2011; Sherer et al. 2003; Wirdefeldt et al. 2011), l'apparition de cancers hématopoïétique, du cerveau, ou de la prostate (Alavanja et al. 2004; Merhi et al. 2007; Pukkala et al. 2009; Weichenthal et al. 2010) ou encore des effets neurocomportementaux (Baldi et al. 2011; Baldi et al. 2003) est fréquemment rapportée. De même, de nombreuses études ont montré qu'une exposition professionnelle aux pesticides augmentait le nombre de dommages à l'ADN (Agopian et al. 2009; Atherton et al. 2009; Bolognesi 2003; Bolognesi et al. 2011; Gallois et al. 2011; Lebailly et al. 1998; Simoniello et al. 2010; Zeljezic et al. 2009). Suite à ce constat, il est légitime de se préoccuper des risques pour la santé encourus par la population générale, exposée à des mélanges de pesticides à faibles doses *via* l'alimentation.

À ce jour peu d'études sur les effets des mélanges de pesticides sont disponibles. Dans la majorité des cas, les pesticides testés en combinaison sont choisis dans le but de déterminer essentiellement la présence ou non d'interactions et/ou d'effet additif entre les différents composants, en se basant soit sur un effet connu soit sur un mécanisme d'action bien défini (Jacobsen et al. 2009; Ojha et al. 2011; Rider et al. 2009). C'est le cas des études sur les pesticides inhibant l'acétylcholine estérase (AChE) (Boyd et al. 1990; Marinovich et al. 1996).

Peu de données existent également sur les effets génotoxiques des mélanges (Das et al. 2007; Demisia et al. 2007; Lodovici et al. 1997; Ojha et al. 2011). La plupart d'entre elles concernent essentiellement l'étude de marqueurs d'exposition professionnelles, comme l'apparition de micronoyaux dans les lymphocytes (Bolognesi et al. 2011; Singh et al. 2011). Certaines toutefois s'intéressent à la population générale et ont étudié la génotoxicité de pesticides qui ont été retrouvés dans l'alimentation (Lodovici et al. 1997). Le mode d'action d'une substance génotoxique à l'autre étant différent (production d'ERO, cassures d'ADN ...), il est difficile de prédire les interactions entre composés génotoxiques.

III. Objectifs de la thèse et stratégie adoptée

Bien que les pesticides génotoxiques soient systématiquement écartés de la liste des substances autorisées, il est possible que des composés rémanents à faible dose puissent avoir un faible potentiel génotoxique qui soit ignoré. Le manque de sensibilité de certains tests utilisés, l'utilisation de modèles peu pertinents pour l'Homme, les phénomènes d'interactions au cours d'une multiexposition, ainsi que la sensibilité/spécificité de certains tissus rendent plausible cette hypothèse de travail. Le développement de nouveaux tests de génotoxicité plus sensibles, adaptés aux analyses à haut débit et capables d'intégrer la biotransformation des xénobiotiques permet de faciliter ces approches et de répondre à la problématique.

A. Démarche expérimentale

Plusieurs questions se posent à propos du risque pour le consommateur, d'une exposition aux résidus de pesticides : (1) comment estimer qualitativement et quantitativement la multiexposition ? (2) Est-ce que les mélanges ont des effets génotoxiques que ne permettent pas de prédire les données obtenues sur chaque substance prise individuellement ? (3) Est-ce que les pesticides à l'état de traces peuvent entraîner un effet génotoxique mesurable ?

Nous nous proposons d'aborder la première question, en caractérisant la co-exposition à partir des données disponibles à l'ANSES (base de données de contamination des aliments provenant des plans de surveillance et de contrôle, ainsi que l'étude des consommations alimentaire INCA2) et de développer un modèle statistique (Crépet and Tressou 2011) permettant de déterminer les principaux mélanges de pesticides auxquels la population française est exposée. Cette approche sans a priori tient compte de l'ensemble des pesticides pour lesquels le pourcentage de données de contamination avec des valeurs quantifiées est supérieur à 10 % (dans au moins une denrée), et non pas en choisissant une famille de pesticides ayant le même mode d'action, ou une structure chimique commune.

Une fois les mélanges de pesticides identifiés, un premier criblage est réalisé pour rechercher leurs effets génotoxiques potentiels. Si l'étude de la génotoxicité peut se faire à partir de tests validés figurant dans les lignes directrices de l'OCDE, il y a plusieurs avantages, à réaliser l'étude à partir d'un test tel que H2AX, qui a été récemment développé au laboratoire (Audebert et al. 2011; Audebert et al. 2010). Contrairement aux autres, ce test permet d'analyser à la fois la génotoxicité directes et

indirectes (CDB d'ADN/formation d'adduit/ERO), et toutes les lésions d'ADN débouchant sur des CDB. Il permet d'évaluer également l'implication de la biotransformation des composés dans l'effet observé, et peut être réalisé sur un grand nombre de types cellulaires. Pour le criblage des mélanges, plusieurs lignées cellulaires humaines représentatives des cibles des contaminants alimentaires ou de leurs métabolites ont été choisies : en effet, deux des lignées cellulaires choisies font parties du tractus digestif.

B. Présentation des lignées cellulaires

Les lignées choisies sont : la lignée hépatique HepG2 (ATCC N° HB-8065), la lignée LS174T (ATCC N° CL-188) provenant d'un adénocarcinome de côlon, la lignée ACHN (ATCC N° CRL-1611) provenant d'un adénocarcinome de rein. Sur ces trois lignées, deux ont de grandes capacités métaboliques (LS174T et HepG2), permettant de détecter la génotoxicité des substances mères ainsi que leurs métabolites. Comme indiqué dans le chapitre précédent, la lignée HepG2 possède en effet des enzymes de phase I et II (Westerink and Schoonen 2007a; Westerink and Schoonen 2007b), tout comme la lignée LS-174T (Audebert et al. 2011). La lignée ACHN, qui a une capacité métabolique plus réduite, permet d'identifier d'éventuels effets des mélanges inchangés. En effet, comparée au HepG2, la lignée ACHN n'exprime pas le CYP1A2, et peu les CYP1A1 et CYP1B1 (Iwanari et al. 2002; Kress and Greenlee 1997; Spink et al. 1997), ainsi que les enzymes de phase II (Audebert et al. 2011; Audebert et al. 2010).

Toutes les trois sont maintenues dans du milieu de culture α MEM, contenant 10% de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté et 1% d'antibiotiques (100 U ml⁻¹ pénicilline et 100 μ g ml⁻¹ streptomycine), sous atmosphère humide avec 5 % de CO₂ à 37 °C.

Une quatrième lignée humaine a été testée, il s'agit de SH-SY5Y provenant d'un neuroblastome humain. Elle est issue du sous-clonage d'une lignée hétérogène SK-N-SH et nous a été gracieusement donnée par le Dr JM Zajac (IPBS-CNRS-UMR 5089, Toulouse, France). Cette lignée a été choisie, d'une part, car de nombreuses études ont montré une corrélation entre l'exposition professionnelle aux pesticides et l'apparition de cancers cérébraux, mais d'autre part a montré une plus grande sensibilité aux effets cytotoxiques (Huang et al. 2008). Peu de données existent dans la littérature concernant la présence ou non d'enzymes du métabolisme. Cette lignée cellulaire est toutefois utilisée en présence ou non de S9 dans quelques études, ce qui permet de supposer sa faible capacité à métaboliser (Valdiglesias et al. 2011a; Valdiglesias et al. 2011b). Quotidiennement, elle est

maintenue dans du milieu de culture DMEM/F12, contenant 10 % SVF décomplémenté et 1 % d'antibiotiques (100 U ml⁻¹ pénicilline et 100 µg ml⁻¹ streptomycine), sous atmosphère humide avec 5 % de CO₂ à 37 °C.

À la suite de l'identification d'une famille de pesticides génotoxiques (méthyl-pyrazoles), nous nous sommes intéressés à l'étude de leur potentiel génotoxique sur une lignée lymphocytaire humaine: Jurkat. Elle est cultivée sous atmosphère humide avec 5 % de CO₂ à 37 °C, dans du milieu RPMI avec 10 % de SVF décomplémenté et 1 % d'antibiotiques (100 U ml⁻¹ pénicilline et 100 µg ml⁻¹ streptomycine).

La plupart des lignées cellulaires proviennent de cellules cancéreuses qui peuvent perdre la faculté de réparer l'ADN et peuvent alors donner lieu à des faux positifs. Par exemple, la protéine p53 jouant un rôle dans le processus d'apoptose est retrouvée mutée dans plus de 50 % des cancers (Suzuki and Matsubara 2011), ce qui a pour conséquence d'inactiver son action suppresseur de tumeur. Cette protéine est bien présente dans les lignées HepG2, LS174T, SHSY5Y, ACHN et Jurkat (Forbes et al. 2011), ce qui permet d'éviter une partie des faux-positifs, et de s'assurer qu'elles ont bien gardé leur capacité à amorcer le processus d'apoptose.

Ce travail de thèse a conduit à l'écriture de trois publications qui sont incorporées aux chapitres III, IV et V de ce mémoire.

Article 1 : Crépet A., Tressou J., Graillot V., Béchaux C., Pierlot S., Héraud F. and J.Ch Leblanc. *Identification of the main pesticide residue cocktails to which the French population is exposed: a Bayesian approach.* Soumise à la revue Environmental Research.

Article 2: Graillot V., Takakura N., Le Hégarat L., Fessard V., Audebert M. and Cravedi J.P. 2012 Genotoxicity of pesticide mixtures in the diet of the French population. Environmental Molecular Mutagenesis, 53(3):173-84.

Article 3: Graillot V., Cravedi J.P. and Audebert M. Evidence of the *in vitro* genotoxicity of methyl-pyrazole pesticides on human cells. Mutation Research Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, soumise.

Chapitre III :

Détermination des principaux mélanges de pesticides auxquels la population Française a été exposée en 2006

Nous proposons dans cette partie de déterminer quels sont les mélanges de pesticides auxquels la population générale française a été le plus exposée en 2006. Dans de nombreuses études qui s'intéressent aux effets toxicologiques combinés, le choix des substances à étudier porte soit sur des molécules de même famille chimique (Ojha and Srivastava 2012; Ojha et al. 2011), soit sur des composés ayant le même mode d'action, soit sur des molécules dites prioritaires, du fait de leurs fortes présences dans l'alimentation (Lodovici et al. 1997; Marinovich et al. 1996). Dans notre étude, nous avons fait le choix d'utiliser une approche sans a priori, c'est à dire que le choix des pesticides à analyser n'a pas été défini à l'avance selon les critères cités ci-dessus.

L'exposition de la population aux substances chimiques ne peut pas, en général, être mesurée directement. Pour y parvenir, nous avons dans un premier temps déterminé l'exposition alimentaire aiguë et chronique aux résidus de pesticides, obtenue en combinant les données de consommations avec les teneurs en résidus de pesticides, présents dans les aliments. Dans un deuxième temps, la co-exposition a été modélisée et enfin, les mélanges de pesticides ont été déterminés à l'aide d'une méthode statistique.

I. Présentation des données

A. Données de consommation

Les données de consommation sont issues de l'étude INCA2 (étude Individuelle Nationale des Consommations Alimentaires) qui a été réalisée par l'ANSES en 2006/2007, auprès d'un échantillon représentatif de la population française métropolitaine (Afssa 2009). Cette base de données regroupe les habitudes et les consommations alimentaires de 4079 participants, regroupés en deux populations : les enfants de 3 à 17 ans et les adultes de 18 à 79 ans. Le recueil des données s'est effectué en 3 vagues de décembre 2005 à avril 2007, afin de tenir compte des variations saisonnières. Les consommations ont été renseignées pendant 7 jours consécutifs, à l'aide de cahiers de consommations. Les quantités consommées ont été décrites à partir d'un cahier photographique de portions (Hercberg et al. 1994). Cette base de données inclut les informations relatives à 4 079 personnes, représentant 28 169 journées de consommation alimentaire, correspondant à 80 052 repas principaux (petits déjeuners, déjeuners, dîners), 38 771 prises alimentaires hors repas et à 503 724 aliments consommés. Au final, 1 280 aliments organisés en 43 groupes et en 110 sous-groupes ont été répertoriés (Dubuisson et al. 2010).

La sélection des participants a été réalisée selon un plan de sondage stratifié à 3 degrés. De ce fait, pour obtenir des données individuelles, un ré-échantillonnage des individus a été réalisé en tenant compte du poids attribué pour chaque individu.

Seules les données des individus normaux-déclarants (1898 adultes et 1439 enfants après ré-échantillonnage) sont utilisées pour l'étude, c'est-à-dire les individus pour lesquels les besoins énergétiques sont couverts par les consommations qu'ils ont effectivement déclarées.

Pour combiner les données de l'étude INCA2 avec les données sur la présence de résidus de pesticides, les aliments tels que consommés ont été fractionnés en denrées brutes à l'aide d'une table de conversion. Plus de 654 recettes ont été ainsi créées à partir des 1280 aliments répertoriés.

B. Données sur les résidus de pesticides présents dans les aliments

Nous disposons des données sur la concentration de résidus de pesticides dans les aliments. Ces données proviennent des programmes de surveillance et de contrôle des résidus de pesticides effectués par les ministères chargés de la consommation, de l'agriculture et de la santé. De plus, nous disposons des données du régime entier de la population française à partir de l'étude INCA2, ce qui nous permet de calculer l'exposition apportée par le régime entier. Les données utilisées pour évaluer l'exposition alimentaire aux résidus de pesticides concernent donc les denrées d'origine animale, végétale et les eaux de boissons.

Les échantillons ont été prélevés en 2006 dans toute la France. Les analyses ont été réalisées sur les denrées brutes et sur quelques produits transformés (jus de fruits, farine). Les données des résidus de pesticides dans les denrées végétales proviennent des plans de surveillance et de contrôle de la DGCCRF (Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et la Répression des Fraudes). Les 4 713 échantillons ont été prélevés sur 141 denrées brutes ou transformées mises sur le marché français (DGCCRF 2008). Au total, 279 résidus de pesticides ou métabolites ont été recherchés, ce qui correspond à 31 538 couples pesticide/denrée. Les données issues des plans de contrôle des denrées biologiques n'ont pas été intégrées dans l'étude ; l'hypothèse étant que le régime biologique est un régime particulier, qui n'est pas adopté par l'ensemble de la population et peu de résidus doivent être retrouvés sur les aliments (règlement 834/2007 ; règlement 967/2008/CE). La dernière étude de l'EFSA confirme également la faible teneur en résidus de pesticides dans les échantillons biologiques analysés dans toute l'Europe (EFSA 2011a).

C. Choix des couples pesticide/denrée à inclure dans l'évaluation de l'exposition

Une première étape consiste à identifier les couples pesticide/denrée à inclure dans l'évaluation de l'exposition. Sur les 279 résidus recherchés, tous ne sont pas pertinents à étudier. La plupart des pesticides qui ont été analysés ne sont pas détectés ou sont très peu retrouvés dans les denrées. Une première sélection des pesticides à inclure est alors réalisée, à partir du critère suivant : toutes les substances qui ont été retrouvées dans au moins une denrée végétales, animales ou provenant des eaux de consommation sont retenues (154 pesticides). Nous avons ensuite fait une deuxième hypothèse à partir des données sélectionnées. Il a été considéré que les pesticides dans l'eau sont un faible contributeur dans l'exposition alimentaire. À partir de cette hypothèse, les résidus quantifiés dans l'eau ont été comparés aux autres résidus retrouvés dans les denrées végétales et animales et seules les substances qui sont présentes au moins une fois dans une des trois denrées sont retenues. Le nombre de pesticides à étudier s'élève alors à 128. Enfin un troisième critère est retenu, en s'intéressant uniquement aux pesticides pour lesquels le pourcentage de données de contamination avec des valeurs quantifiées est supérieur à 10%, dans au moins une denrée. Une exception est faite pour les pesticides n'ayant pas 10% de résultats quantifiés mais ayant des niveaux résiduels proches de la Limite de détection (LOD)/ Limite de quantification (LOQ). La LOD est définie comme la plus petite concentration de l'analyte pouvant être détectée, mais non quantifiée, dans les conditions expérimentales décrites de la méthode. La LOQ correspond à la plus petite concentration de l'analyte pouvant être quantifiée avec une incertitude acceptable, dans les conditions expérimentales décrites de la méthode.

Au final, 79 pesticides sont sélectionnés pour l'estimation et la modélisation des co-expositions (Crépet and Tressou 2011).

D. Traitement des données censurées

Dans les bases de données dont nous disposons, tous les résultats d'analyses qui ont été réalisés sont répertoriés et de nombreuses substances ne sont pas retrouvées ou quantifiées dans les aliments. Dans de nombreux cas, cette absence s'explique par le fait que les laboratoires appliquent des protocoles pouvant détecter plusieurs résidus à la fois à partir du même échantillon. Les données dites « censurées » correspondent alors à des mesures qualitatives et non quantitatives, c'est-à-dire qui sont inférieures aux limites de détection (LOD) et limites de quantification (LOQ).

Plusieurs hypothèses pour traiter ces données de censures peuvent être appliquées, pour évaluer l'exposition. D'après la ligne directrice internationale (GEMS/FOOD-EURO, 1995), si l'échantillon comporte moins de 60 % de valeurs censurées, il faut remplacer les LOD et LOQ par LOD/2 et LOQ/2. En revanche, si l'échantillon comporte plus de 60 % de valeurs censurées, il faut procéder selon deux scénarios les plus extrêmes : soit on remplace ces valeurs censurées par les limites elles-mêmes (protection haute : démarche maximaliste), soit en remplaçant par 0 (protection basse : démarche minimaliste). Dans tous les cas, les scénarios choisis influencent l'évaluation de l'exposition. Dans notre étude, différentes hypothèses de travail ont été soumises lors de la mise au point du modèle statistique pour calculer la co-exposition aux pesticides :

- La première hypothèse de travail consiste à faire un tirage aléatoire uniforme (100 tirages) entre 0 et la LOD/LOQ (voir paragraphe II).
- La deuxième hypothèse, celle retenue pour déterminer les mélanges, consiste à remplacer les données de contamination censurées par 0.

Nous avons ensuite observé avec la DPR (Direction des Produits Réglementés) si cette absence était liée à une pratique culturale autorisée ou non. D'après les dossiers « PROFile » que possédait la DPR, qui contiennent toutes les données nécessaires pour l'évaluation du risque, nous avons émis l'hypothèse, que si on ne retrouve pas cette molécule dans une denrée et que si l'usage sur cette denrée n'est pas autorisé, alors à la place de faire un tirage aléatoire entre 0 et la LOD/LOQ, la valeur peut être remplacée par 0 (dans le cas de la première hypothèse). Parmi les 17 dossiers dont nous disposons, seules 2 substances sont concernées: le benalaxyl et la cyfluthrine (les valeurs censurées des tomates, aubergines, melons, et pastèques pour le benalaxyl et les lentilles pour la cyfluthrine ont été remplacées par 0).

II. Co-exposition

Pour chaque couple pesticide/denrée, plusieurs analyses ont été effectuées, ce qui permet de construire une distribution empirique de contamination. Cette distribution est obtenue par un tirage aléatoire uniforme (100 tirages) entre les différentes mesures quantifiées, en respectant la probabilité d'appartenance à chaque intervalle, ceci permettant d'intégrer la variabilité de la contamination des aliments.

La première étape consiste à déterminer l'exposition aiguë (quantité d'aliment consommée pendant une journée) de la population générale aux résidus (qui a été divisée en deux groupes : les enfants et les adultes).

On estime l'exposition individuelle à un pesticide de la façon suivante : pour chaque denrée a traitée avec un pesticide p , la consommation journalière $C_{i,a}$ (obtenue par tirage aléatoire parmi les 7 jours de l'enquête INCA2) d'un individu i est multipliée par une valeur de contamination de l'aliment (tirée aléatoirement dans la distribution empirique de contamination de chaque couple denrée/pesticide). Ces apports obtenus pour chaque denrée, sont ensuite additionnés pour obtenir une valeur d'exposition aux pesticides P dues à l'ensemble des denrées. La valeur obtenue est divisée par le poids corporel du consommateur w_i . Cette procédure est répétée cent fois. Le 95^{ème} percentile de la distribution ainsi obtenue pour un individu et un pesticide donné est utilisé. Les données sont ensuite transformées en logarithme de base 10, puis centrées et réduites sur l'ensemble des expositions individuelles pour chaque pesticide. Au final, les expositions individuelles des 3337 individus aux 79 pesticides sont ainsi estimées.

L'exposition chronique est calculée en remplaçant la quantité consommée au cours d'une journée par la consommation moyenne sur la semaine de la denrée. La moyenne de la distribution de l'exposition ainsi obtenue est utilisée ensuite dans l'analyse.

Formule :

$$E_{i,p} = \frac{\sum_{a=1}^{A_p} c_{i,a} \times q_a}{w_i}$$

III. Détermination des mélanges de pesticides : développement d'un modèle statistique bayésien non paramétrique.

A. Méthodes

Pour déterminer les mélanges, un modèle hiérarchique bayésien non paramétrique a été développé à l'ANSES, en collaboration avec l'unité Métarisk de l'INRA (Crépet and Tressou 2011). Ce modèle permet de classer les individus de chaque population (adultes/enfants) en sous-groupes ayant le même profil de co-exposition, appelés « clusters ». Trois critères ont prévalu pour établir les mélanges de pesticides : le niveau d'exposition du cluster doit être élevé, l'exposition aux pesticides doit être simultanée (ce qui se traduit par des corrélations fortes entre les expositions) et le nombre d'individus exposés doit être important.

B. Résultats

À partir des expositions chroniques, les profils de co-exposition aux différents pesticides ne peuvent être classés en différents clusters, quelle que soit l'hypothèse de traitement de la censure utilisée. Un seul cluster a été ainsi identifié, comportant la plupart des individus (1 671 individus), ce qui révèle une très grande homogénéité des expositions. Ces résultats n'ont alors pas pu être retenus dans l'étude des effets toxicologiques combinés. Les principaux résultats donnés dans cette étude concernent alors les mélanges obtenus en étudiant les co-expositions aiguës des deux populations.

À partir des expositions aiguës, selon l'hypothèse utilisée pour le traitement des données de censures, la classification des clusters d'individus ainsi que la composition des mélanges est différentes. Ceci est observé aussi bien pour les adultes que les enfants.

Avec la censure fixée à 0, les corrélations observées entre les pesticides sont moins élevées qu'avec l'hypothèse du « tirage aléatoire ». Ainsi le critère du coefficient de corrélation minimum pour sélectionner les pesticides d'un cocktail est fixé à 0,70 alors qu'elle est de 0,95 pour le tirage aléatoire (Tableau 4). Le nombre de pesticides composant le mélange est lui aussi moins important : 2 à 5 pesticides (censure à 0) contre 2 à 17 (tirage aléatoire) (Tableau 4). Cela s'explique par le fait qu'avec l'hypothèse de censure à 0, les expositions sont plus variables, ainsi les corrélations entre les expositions aux différents pesticides sont moins importantes. La valeur de censure influence donc fortement les niveaux d'exposition.

Avec l'hypothèse de censure à 0, l'analyse statistique met en avant les pesticides les plus souvent retrouvés dans les aliments. Le nombre de mélanges entre les adultes et les enfants est au final de 7 car certains sont composés des mêmes pesticides contenus dans d'autres cocktails de plus grande taille (Tableau 5).

Il a alors été décidé d'utiliser les résultats obtenus avec la censure fixée à 0 pour les études toxicologiques combinées et d'analyser l'ensemble des mélanges ainsi obtenus. En revanche les pesticides identifiés à partir de l'hypothèse du tirage aléatoire ont été étudiés seuls afin de mettre au point dans un premier temps la technique d'ICW avec des composés phytosanitaires (Chapitre V).

Exposition 79 pesticides	Traitement Censure	Nombre de clusters d'individus	Nombre d'individus dans chaque cluster	Nombre de pesticides identifiés	Nombre de mélanges de pesticides	Nombre de pesticides par cocktails
Adultes Exposition aigüe	Tirage aléatoire	3	337	34	0	2 à 17
			884		12	
	Fixée à 0	4	648	18	8	2 à 3 2 à 4 2 à 4
			489		0	
256			5			
Enfants exposition aigüe	Tirage aléatoire	2	743	39	15	2 à 17
			651		4	
	Fixée à 0	3	699	17	0	2 à 5 2 à 5
			239		3	
Adultes exposition chronique	Censure 0	1	1671	26	8	1 à 7

Tableau 4 : Description des clusters d'individus et des mélanges de pesticides obtenus à l'aide du modèle statistique. Ces clusters ont été déterminés à partir des expositions aiguës et chroniques des adultes et des enfants, selon les deux hypothèses du traitement des données censurées.

Lorsque le nombre de mélanges associé à un cluster est noté 0, ce cluster n'a pas été retenu pour définir les cocktails car les niveaux d'exposition des individus correspondant sont faibles.

	Substance active	Statut Règlement (EC) No 1107/2009 (liste arrêtée en 09/2011)	Fonction	Famille	Classification cancérogènes/ mutagènes selon l'Union Européenne	Aliments contributeurs
Mélange 1	Diphenylamine	Non inscrit	Fongicide, insecticide	Amine		Pommes Poires
	Tolyfluanid	Non inscrit	Fongicide	Sulphamide		
	Phosalone	Non inscrit	Insecticide, Acaricide	Organophosphoré		
	Propargite	Non inscrit	Acaricide	Sulfite ester	Carc.2	
	Captan	Inscrit	Fongicide, bactéricide	Phthalimide	Carc.2	
Mélange 2	Linuron	Inscrit	Herbicide	Urée		Carottes Navets
	Chlorfenvinphos	Non inscrit	Insecticide	Organophosphoré		
	Ethion	Non inscrit	Insecticide, Acaricide	Organophosphoré		
Mélange 3	Fenitrothion	Non inscrit	Insecticide	Organophosphoré		Raisins de table Fraises
	Quinoxifen	Inscrit	Fongicide	Quinoline		
	Fenhexamid	Inscrit	Fongicide	Hydroxylanilide		
	Triadimenol	Inscrit	Fongicide	Triazole		
	Pyrimethanil	Inscrit	Fongicide	Anilinopyrimidine		
	Penconazole	Inscrit	Fongicide	Azole		
Mélange 4	λ-Cyhalothrine	Inscrit	Insecticide	Pyrethroids		Cerises Pêches Fraises Tomates Salades Raisins de table Poivrons
	Iprodione	Inscrit	Fongicide	Dicarboximide	Carc.2	
	Procymidone	Non inscrit	Fongicide	Dicarboximide		
	Cyprodinil	Inscrit	Fongicide	Anilinopyrimidine		
	Fludioxonil	Inscrit	Fongicide	Phenylpyrrole		
Mélange 5	DDT	Banni	Insecticide	Organochloré	Carc.2	Viandes Poissons
	Dieldrin	Banni	Insecticide	Cyclodiène Organochloré	Carc.2	
Mélange 6	Maleic hydrazide	Inscrit	Herbicide	Pyridazine		Pommes de terre oignons
	Chlorpropham	Inscrit	Herbicide	Carbamate	Carc.2	
Mélange 7	Imazalil	Inscrit	Fongicide	Imidazole		Agrumes
	Methidathion	Non inscrit	Insecticide	Organophosphoré		

Tableau 5 : Composition des 7 mélanges de pesticides obtenus à partir des expositions aiguës des adultes et des enfants, selon l'hypothèse de censure fixée à 0.

Classification des substances cancérogènes et mutagènes selon l'Union Européenne : Carc.1 : substance que l'on sait être cancérogène pour l'homme, Carc.2 : substance préoccupante pour l'homme en raison d'effets cancérogènes possibles ; Mut.1 : substances dont la capacité d'induire des mutations héréditaires est avérée, Mut2 : substances préoccupantes du fait qu'elles pourraient induire des mutations héréditaires dans les cellules germinales des êtres humains. Aucun pesticide parmi les 25 n'est classé mutagène par le règlement Européen.

Article 1

**Identification of the main pesticide residue cocktails to which the French population
exposed: a Bayesian approach**

A. Crépet^{a*}, J. Tressou^b, V. Graillet^{a,c}, C. Béchaux^a, S. Pierlot^a, F. Héraud^a and J.Ch Leblar

^a ANSES, French Agency for Food, Environmental and Occupational Health Safety, 27 Avenue du Général Leclerc, 94701 Maisons-Alfort, France

^b INRA-UR 1204 Met@risk, Food Risk Analysis Methodologies, National Institute Agronomic Research, 16 rue Claude Bernard, 75231 Paris, France

^c INRA, UMR1331, Toxalim, Research centre in food toxicology, INP, ENVT, EIP, UPS, 31027 Toulouse, France.

*Corresponding author: amelie.crepet@anses.fr, Tel +33 (0)1 49 77 26 78, Fax +33 (0)1 49 77 38 92

Abstract

Because of intensive use of pesticides and their potential persistence in environment, various residues of pesticide can be found in the diet. Consumers are therefore exposed to complex cocktails of pesticides which may have combined adverse effects on human health. In modelling food exposure to multiple pesticides, this paper aims to determine the main cocktails to which the French general population is exposed. Dietary exposure of 3 337 individuals from the French national consumption survey INCA2 is assessed for 79 pesticide residues, based on results of the 2006 French food monitoring programs. Individuals are divided into groups with similar patterns of co-exposure using the clustering ability of a Bayesian nonparametric model. From the 5 groups of individuals with the higher exposures, cocktails are formed by the pairs of pesticides with correlations above 0.7. Thus, 7 cocktails made of 2 to 6 pesticides are characterized. The food commodities that contribute the most to the exposure to each cocktail are identified. It appears that pesticides forming a cocktail can be either components of the same plant protection product, used together on the same crop or consumed together during a meal. From the 25 pesticides forming the cocktails, 7 are to date banned from Europe and 2 which are the DDT and Dieldrin, are well known as persistent organic pollutants. The approach developed is generic and can be applied to all kind of substances present in the diet to characterize the mixtures that must be studied as priorities for their adverse effects on health.

Keywords: Pesticide residue mixtures; co-exposure clustering; multiple exposure; food risk assessment; combined effects

Disclaimer

The findings and conclusions in this paper are those of the authors and do not necessarily represent the views of the French agency for food, environmental and occupational health safety (ANSES). The authors declare they have no conflict of interests.

Funding sources

This work enters in the framework of 2009 – 2011 PERICLES (n° 2008-CESA 01601 research program, granted by the French research agency (*Agence Nationale de la Recherche, ANR*) and the former French agency for environmental and occupational health safety (*Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail, AFSSET*).

1. Introduction

The use of pesticides, which became essential in the last decades for intensive farming, results in a widespread presence of residues in water, soil and foodstuffs. In its last report, the European Food Safety Authority (EFSA) acknowledges that pesticide residues were detected in 46.7% of the 67 887 food samples analysed throughout the European Union in 2008. Residues of at least two pesticides were found in 26.7% of the analysed samples, among which one third contained more than 4 pesticide residues (EFSA, 2010). Consumers are thus exposed to complex cocktails of pesticides, which are suspected to represent a risk for human health (EFSA, 2008; WHO, 2009). To date, there is an international consensus on the need to consider cocktails of chemicals to characterize the risk of human co-exposures (European Commission, 2011; Meek et al., 2011). The risk assessments conducted worldwide are focused on chemicals belonging to the same chemical family (carbamates, organophosphorus pesticides, triazoles) and/or sharing the same mechanisms of action (ACROPOLIS, 2010-2013; Boobis et al., 2008; Bosgra et al., 2009; EFSA, 2009; EPA, 2002; EPA, 2007; Müller et al., 2009; Reffstrup et al., 2010). There are based on cumulative exposure and cumulative effects of the substances considering that interactions between substances are not likely to play a large role in term of health effect. Such studies can be of limited interest for health risk assessment, since they may not reflect real mixtures of pesticides which likely to occur through the actual diet. The PERICLES research program coordinated by the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health Safety (ANSES), aims to first identify pesticide cocktails to which the French population is really exposed through the diet and second to investigate the possible combined effects of their components on human cells. Within this program, an original statistical method based on a Bayesian nonparametric approach is being developed to define the combination of pesticides to which the French general population is simultaneously and most heavily exposed. The pesticides forming

cocktails are selected based on their probability to simultaneously occur, considering both the pesticide residues patterns in food and the population's dietary habits. The mathematical description of the model developed for pesticide exposure clustering was detailed and applied to the French adult and child population co-exposures to 79 pesticides in (Crépet and Tressou, 2011). For the adult population, this study resulted in the selection of 20 cocktails composed of between 3 and 17 pesticides. In this first application, the non-detect values of pesticide residues in food were assumed to be uniformly distributed between 0 and the limit of reporting (LOR), which corresponds to the analytical limit of detection or quantification. However, this major assumption is unrealistic when the pesticide is not used on a crop. New calculations were consequently conducted assuming an absence of residues in food samples with analytical values below the LOR. This paper describes the cocktails obtained in this manner, the proportions of each pesticide composing the cocktails and the foodstuff which contribute the most to the exposure to the different cocktail. The basic idea of the exposure modelling is first presented.

2. Methods

2.1. Pesticide selection and residual concentration

Data on pesticide residues in food and drinking water come from the annual monitoring programs implemented in 2006 by the French ministries in charge of consumer affairs, agriculture and health. These programs provide analytical results for up to 300 different pesticide residues searched in about 150 kinds of raw agricultural commodities (RACs), water included. Residues of 79 pesticides, for which at least 10% of analytical results were quantified, are retained for the study. They are analysed in 120 RACs, representing 306,899 analytical results and 8,364 food/residue combinations. For each combination, the residue level distribution is approximated by a histogram. Each interval of the histogram is constructed by two consecutive observed residue levels and the probability of lying in the

interval is estimated by the proportion of corresponding observed values. A null residue level is attributed to an analytical result reported “below the limit of reporting”.

2.2. Individual food consumption data

Consumption data come from the second "Individual and National Study on Food Consumption", INCA2 survey, carried out by the French Food Safety Agency (Dubuisson et al., 2010; Lioret et al., 2010). This survey was conducted between 2005 and 2007 covering seasonal variations. Each participant was asked to complete a seven-day food diary. Two samples of 1,898 adults aged 18-79 years and of 1,439 children aged 3-17 years are built out of the original samples by carrying out random trials with replacement respecting the individual sampling weights representing frequencies in the entire French population. Only normo-reporters, i.e. individuals whose energetic needs are covered by the declared consumptions, are included. The time window for short term exposure calculation is a 24-hour day. One day is randomly selected for each individual from the 7 consecutive days records to avoid autocorrelation problems. To match the consumption data to the pesticide residues levels in food, the 1,305 “as consumed” food items defined in the INCA2 survey are broken down into 181 RACs using food recipes.

2.3. Dietary co-exposure assessment

For each commodity a and pesticide p , the individual consumption quantity c_{ia} is multiplied by one residue level q_{pa} and adjusted by the body weight w_i of the individual i to obtain a daily intake. The individual consumption quantity c_{ia} corresponds to the sum of all the quantities of commodity a consumed during the selected day. The daily intakes calculated for each commodity are summed to obtain a total daily exposure in micrograms of the chemical per kilogram of body weight of the consumer for the selected day ($\mu\text{g}/\text{kg BW}/\text{d}$). This process is performed for $m = 1, \dots, 100$ values randomly selected from the residue level distribution

of each food/residue combination. The final data set comprised series of 100 possible daily exposures $x_{pim} = \left(\sum_{a=1}^{A_p} c_{ia} \times q_{pam} \right) / w_i$ to each pesticide $p = 1, \dots, P$, for each individual $i = 1, \dots, n$. The series of exposures represent the total uncertainty of the exposure of an individual during a day. A number of 100 values is sufficient to accurately estimate the exposure distribution as it has been tested in (Crépet and Tressou, 2011). To make comparison between exposure levels possible, the exposure were transformed in log scale, centered around the mean and rescaled by the standard deviation for each pesticide and across individuals. Finally, the 95th percentile with respect to the uncertainty distribution of the scaled and log-transformed exposure to the pesticide p of each individual i during a day is retained to form a matrix of size $n \times P$ of the population co-exposure to the P pesticides.

2.4. Individual co-exposures clustering

As diet is a combination of various food consumed by individuals, the univariate distribution of a population exposure to a pesticide is multimodal. This implies that the population can be clustered in groups considering the level of exposure to a pesticide. Moreover, each individual is daily exposed to several pesticides. The clustering should be performed considering the levels of exposures to the 79 selected pesticides. Therefore, the population co-exposures to the P pesticides are modelled with a Bayesian nonparametric model to cluster individuals in homogeneous groups (Crépet and Tressou, 2011). This fully Bayesian approach consists of building an infinite mixture model to account for the different levels of the population co-exposures. Each mixture component represents a homogeneous group of individuals with similar patterns of pesticide residues exposures. The nonparametric approach is chosen for the reason that the number of groups with similar co-exposure is unknown *a priori*. In such an approach, the number of mixture components is potentially unlimited, and is itself a random variable which is estimated from the data. Let $x_{i=1, \dots, n}$ be a P dimensional vector $x_i = (x_{i1}, \dots, x_{ip}, \dots, x_{iP})$ of co-exposures for individual i . The probability distribution of the

estimated co-exposures x_i is written as $f(x_i) = \int_{\Theta} k(x_i|\theta)G(d\theta)$, where $k(\cdot|\theta)$ is the density of the mixture components with parameter θ and G the unknown mixing distribution over this parameter. A multivariate Normal distribution $N_p(\mu, \Sigma)$ with mean vector $\mu \in R^P$ and random covariance matrix $\Sigma \in R^{P \times P}$ is chosen as the kernel density of the mixture. In this way, the correlations of the P pesticides are modelled and individuals are clustered according to both their co-exposure levels and their co-exposure correlations. The mixing distribution indicating the group to which the individual is allocated is modelled with a Dirichlet process (Ferguson, 1973; Lo, 1984). A Wishart-Normal distribution is chosen to model the *prior* distribution of the mixture parameters (μ, Σ) . The entire model and its algorithm are detailed in (Crépet and Tressou, 2011).

2.5. Correlations between pesticide exposures

The model produces a specific vector μ_j of the mean exposures to the P pesticides and a matrix of covariances Σ_j , for each group j of individuals. Groups of individuals with higher exposures, i.e. with a majority of components of μ_j higher than the population mean, are selected to define cocktails of pesticides. The covariance matrices Σ_j associated with the selected groups are studied to determine the pesticides to include in a cocktail. For each selected group of individuals, pesticides with at least one correlation above an arbitrary fixed value of 0.7 are selected considering that their correlation with another pesticide is high. The proportion $q_{j,p}$ of each residue p composing a cocktail of 3 pesticides, for example, is calculated by the ratio of its mean exposure level $\mu_{j,p}$ in the selected group of individuals and the sum of the mean exposure of all residues composing this cocktail: $\mu_{j,p}/(\sum_{p=1}^3 \mu_{j,p})$. For cocktails shared by several groups of individuals, for example 2 groups, the mean of the different proportions obtained from each group is used: $(q_{1,p} + q_{2,p})/2$.

2.6. Main food contributors to the pesticide exposure cocktails

In order to determine the RACs that explain the exposure to the cocktails a principal component analysis (PCA) is performed for each cocktail considering the general adult population exposure. The exposure to a given cocktail is thus summarized by one latent variable which explains the most part of the inertia. Then, the individual exposure x_{pim} to a pesticide p is broken down in individual exposure by RACs to be used as supplementary variables. The RACs that are the most correlated with the selected latent variable (Fisher test with p-value <0.05) are the ones that explain the most of the inertia and thus the population exposure to the cocktail. Therefore, the cocktail exposure is strongly related to the consumption of a particular RAC either because there is a huge correlation between this RAC for one pesticide forming the cocktail and the axis, either because there are several intermediate correlations between this RAC for several pesticides forming the cocktail and the axis. Finally, for each selected RAC the mean exposures to each pesticide forming a cocktail are summed to identify the RAC(s) with the higher levels of exposure to a cocktail. Note that this sum has no biological significance but is useful to identify the RAC contribution to the total cocktail exposure.

3. Results

3.1. Groups of individuals with similar patterns of pesticide exposures

The model clusters the child population co-exposures into 30 groups. The majority of children are gathered into three main groups composed of 699, 238 and 239 individuals. The 263 remaining individuals shared out in the 27 other groups are discarded. The first two groups consist of highly exposed children to a large number of pesticides, whereas the last group is composed of children exposed to the lowest levels of the 3 groups. Figure 1 represents the co-exposure to the 79 pesticides of the children of group 2 (light blue lines) and the children of

group 3 (dark blue lines). The different patterns of co-exposures of the two groups can be distinctly viewed on this figure. Due to the centring of the data, the mean exposure of the whole child population is equal to zero. High exposures of a population group to a pesticide are thus identified considering that all exposure values, or at least the median exposure of this group, are above 0. To illustrate this, the box plots of the three main groups of children are plotted. For example, in Figure 2, the box plot of exposures to Azinphos Methyl of group 2 individuals is above zero indicating “high” exposure to that pesticide for this group. By contrast, the box plots of the individuals of group 3 (Figure 3) are below zero, indicating “low” exposure to that pesticide.

The adult population is clustered into 4 main groups respectively composed of 256, 655, 302 and 489 individuals (786 discarded). The first three groups are the most highly exposed to a large number of pesticides.

3.2. Cocktails of pesticide residues

After screening the correlations between the exposures to the 79 pesticides of the respectively 2 and 3 most exposed groups of children and adults, 25 pesticides with at least one correlation above 0.7 are selected. Figure 4, shows correlation levels between the exposures to the 25 selected pesticides for the child group 2, is used to determine the cocktails. For example, most children clustered in the group 2 are simultaneously exposed to Chlorfenvinphos, Ethion and Linuron gathered in a cocktail. The exposures of this group to DDT and Dieldrin are also highly correlated; another cocktail is therefore created. For this group, pesticides of cocktails 1 and 4 include correlation factors lower than 0.7. Those cocktails have been formed based on the exposure correlations of child group 1 and adult groups. Following this procedure, 7 cocktails composed of between 2 and 6 pesticides are defined and listed in Table 1 for the children and in Table 2 for the adults. The groups of individuals from which each cocktail has

been created are noted by a sign “+”. The cocktails 2, 5, 6 and 7 composed of 2 or 3 pesticides are shared by 4 different groups, whereas the cocktails 1, 3 and 4, composed of 5 or 6 pesticides have been determined only from the adult group 3. Note that the correlations of these pesticides in the other groups are also important (Figure 4 for children group 2). For each cocktail, one or two pesticides are present in high proportions. For example, the cocktail 7 consists of 97% of Imazalil and only 3% of Methidathion. The exposure levels of the pesticides forming the cocktails are higher in the groups from which they have been created than in the general population (results not shown).

Apple and pear are food items with significant correlations to the pesticides of cocktail 1. Regarding the exposure levels, apple is the main vector of exposure to the cocktail 1. The RACs with significant correlations to the pesticides of the cocktail 2 are the carrot, parsley, turnips, celeriac and herb but only the carrot are associated to high exposures to the pesticides of this cocktail and can be considered as a main vector of exposure to this cocktail. Only one main contributor, respectively table grape and fish product, is found for the cocktail 3 and the cocktail 5. The food items which contribute the most to the exposure of the cocktail 4 are in decreasing levels of exposure: salads other than lettuce, table grape, peach, lettuce, strawberry and tomato. The potato and the onion have significant correlations with pesticides of the cocktail 6 but potato is vector of higher exposure levels than onion. The main contributors to the pesticides of the cocktail 7 are citrus fruits in decreasing levels of exposure: orange, mandarin and grapefruit.

4. Discussion

This work results in the characterization of 7 cocktails, composed of 2 to 6 pesticide residues. Several factors may explain these cocktails. First, active substances whose residues form a cocktail can be components of the same plant protection product. For example, 8 of the 19

plant protection products currently authorized in France and made of Cyprodynil also contain Fludioxonil (Ministère de l'agriculture et de la pêche, 2011). Both are components of cocktail 4. Active substances whose residues form a cocktail can also be components of different plant protection products, which are used on the same crop. For example, the RAC that contributes the most to the exposure to cocktail 3 is table grape. Vine can be contaminated by two mushrooms: the oidium and the grey mould. The Penconazole and the Quinoxifen are both used to treat the oidium whereas the Pyrimethanil and the Fenhexamid are employed to eliminate the grey mould. These 4 pesticides belong to cocktail 3. Chlorpropham and Maleic Hydrazide, composing the cocktail 6, can both be used to inhibit germination of potatoes, which is one of the main foods contributing to the cocktail 6 exposure. More generally, there can be components of plant protection products used on different RACs tending to be consumed together during a day by the individuals of the group from which the cocktail has been defined. For example, Linuron is an herbicide authorized on carrots, herbs and celeriacs, which are the main contributors of cocktail 2. This can be generalized for cocktail 4: Cyprodinil, Fludioxonil, Iprodione are authorized as fungicide and λ -Cyhalothrin as insecticide on all the food contributing to cocktail 4. Cocktail 5 is composed of former pesticides (DDT and Dieldrin), known today as persistent organochlorine pollutants, for which food of animal origin like fish products have already been shown to be the main contributors to the total exposure (Van Audenhaege et al., 2009). Thus, the cocktails found through this statistical modeling seem to be consistent with agricultural practices and / or the contamination of the environment in France. Nevertheless, due to global food exchanges worldwide, consumers can be exposed to pesticides which are not used in their country but which may be used in other ones. Thus, non authorized pesticides in France can also be found in the cocktails. This is the case of Phosalone and Tolyfluanid for cocktail 1,

Chlorfenvinphos and Ethion for cocktail 2, Procymidone for cocktail 4 and Methidathion for cocktail 7.

These cocktails may rapidly evolve in time, especially between years according to the pest pressure. For example, in 2006 the insect pressure was very low in France. As a consequence, only one authorized insecticide (λ -Cyhalothrin) is found in the cocktails (Agreste, 2009). In the framework of this study, the time window chosen for the exposure assessment is the day and only one year of monitoring program has been taken into account. The stability of the cocktails for the short term exposure would need to be further investigated, by updating the calculation with other years of monitoring. This also raises the question of the pertinence to define cocktails of pesticide residues for the long term exposure. The developed method was also applied to chronic exposure in Crépet and Tressou (2011). However, the algorithm failed to cluster the population. Indeed, in the chronic context, the co-exposure profiles must be too close to be separated into groups. Nevertheless, correlations between the pesticides forming the cocktails obtained in short term context are also found to be high in the chronic exposure context.

Some of the identified cocktails contain residues associated to pesticides which have the same effect on crops. It is the case for example of Cyprodinil, Fludioxonyl and Iprodione, Chlorpropham and Maleic Hydrazide. Being simultaneously exposed to those compounds doesn't seem realistic in a short-term exposure framework. In fact, it sounds to be of low probability a farmer apply different products which act in the same way on crops. This observation can be first explained by the fact in monitoring program one analyzed food sample may be composed of several units, which come from different farmers. It can consequently contain several pesticide residues corresponding to plant products with similar uses. But the main reason is probably linked with the method used to assess the exposure. In fact, the individual exposures to the 79 pesticide residues have been determined

independently, i.e. without taking account of correlation between residue levels within each food sample. To incorporate these correlations, methods such as the one of (Iman and Conover, 1982) which allows to generate correlated random variables into Monte Carlo simulations could have been used. But these methods require all the residues to be analyzed in each food sample. Monitoring data used in this work did not provide residue levels of the *P* pesticides for a sufficient number of samples and were thus not adapted to estimate those correlations. A solution, studied in (ACROPOLIS, 2010-2013), is to complete monitoring data by pesticide usage survey which provide the percentages of crops simultaneously treated with further pesticides.

Another consequence of the independent calculation of individual exposure to the 79 pesticides concerns the way to build the individual vector of co-exposure. In this work, an arbitrary choice was made to retain the 95th percentile of the exposure distribution for each pesticide. In co-exposure assessment, this calculation choice seems unrealistic in the sense that along a day the probability to be exposed to high values jointly for all pesticides is very low. To account for uncertainty of pesticide exposure during a day, the series of 100 possible daily exposures to a pesticide were used in (Crépet and Tressou, 2011). However, due to the high uncertainty of the individual exposure, an individual can be frequently exposed to a low level for one pesticide and to a high level for another pesticide. The clustering of such co-exposure profiles is complex and the correlations between pesticide exposures very low. Thus, the inclusion of exposure uncertainty brings some difficulties to define cocktails of pesticides and needs more statistical developments.

Parameters not included in the present co-exposure assessment that could influence the exposure levels is variability factor between food units and processing factor of the raw agricultural commodities. Variability factors were introduced to integrate the fact that analytical samples in monitoring program are composite samples constituting of more units of

a food (EFSA, 2007). Thus, an individual unit can contain higher residue levels than the analysed (average) composite residue level and the present acute exposure can be underestimated. At the opposite, processing (washing, peeling, baking, etc...) RACs to consumed food can make the exposure lower than the one estimated from residues levels in RAC (Boon et al., 2009a; Boon et al., 2009b). However, we do not expect that by including these variability factors the cocktails will be different.

This model also relies on two major choices, which may impact on the final results. The first one concerns the way to deal with non-detects residues data. In the present work, to bring up pesticides mostly observed in diet, concentrations found below the LOR were set to 0. In previous work, it was considered that these samples may contain some traces of pesticides and residue level values were randomly and uniformly selected between 0 and the corresponding LOR. However, the high number of censored data leads to a high dependency between exposures estimates and values of the LOR. Under this scenario, (Crépet and Tressou, 2011) concluded that the clustering was mostly related to the consumption behavior of individuals rather than the contamination levels. With this method, the individuals of the main groups were simulated as being either highly exposed to all pesticides or slightly exposed to all pesticides. Moreover, cocktails defined from exposures estimated with this treatment were composed of a large number of substances. For example, 5 cocktails among the 20 defined for the adult population were composed of more than 10 substances. The other choice concerns the correlation level retained to define the cocktails. The use of a correlation level lower or higher will impact on the number of cocktails and on their components.

5. Conclusion

This study applies a statistical Bayesian non parametric approach to characterize cocktails of pesticide residues to which the French population is simultaneously highly exposed. Such a generic approach can be extended to all kind of chemicals present in food. Applied on 79

pesticide residues, it results in 7 cocktails composed of 2 to 6 pesticide residues. Further statistical developments as well as better data collection on pesticide residues levels in food are needed in order to consolidate and validate this global approach. Nevertheless, these first results show that pesticide residues to which the French population is mainly exposed are not necessarily belonging to the same chemical family and are not known *a priori* to share the same mechanism of actions. Short term effects on human cells are now studied for both pesticide residues alone or in cocktail within the framework of the PERICLES research program. Unspecific responses including cytotoxicity, apoptosis and oxidative stress, endocrine disruptor effects (analysis of PXR transactivation and target genes regulation) and genotoxic effects (Comet assay, H2AX phosphorylation) are being tested for intestinal, hepatic, renal, colon and nervous human cells.

6. Acknowledgments

The residue data are provided by the French ministries in charge of agriculture, consumers' affairs and health. The authors want to thank Rémy Maximilien and all the participants to PERICLES research program for valuable discussions.

7. References

- ACROPOLIS, EU-project coordinated by the National Institute for Public Health and the Environment (RIVM). Aggregate and Cumulative Risk of Pesticides: an on-line integrated Strategy. <http://www.acropolis-eu.com/>. 2010-2013.
- Boobis, A. R., Ossendorp, B. C., Banasiak, U., Hamey, P. Y., Sebestyen, I., Moretto, A., 2008. Cumulative risk assessment of pesticide residues in food. *Toxicology Letter* 15, 137-150.
- Boon, P. E., Ruprich, J., Petersen, A., Moussavian, S., Debegnach, F., van Klaveren, J. D., 2009a. Harmonisation of food consumption data format for dietary exposure assessments of chemicals analysed in raw agricultural commodities. *Food and Chemical Toxicology*. 47, 2883-2889.
- Boon, P. E., Svensson, K., Moussavian, S., van der Voet, H., Petersen, A., uprich, J., Debegnach, F., de Boer, W. J., van Donkersgoed, G., Brera, C., van Klaveren, J. D., Busk, L., 2009b. Probabilistic acute dietary exposure assessments to captan and tolylfluanid using several European food consumption and pesticide concentration databases. *Food Chem. Toxicol.* . 47, 2890–2898.
- Bosgra, S., Voet, H. v. d., Boon, P. E., Slob, W., 2009. An integrated probabilistic framework for cumulative risk assessment of common mechanism chemicals in food: An example with organophosphorus pesticides. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 54, 124-133.

- Crépet, A., Tressou, J., 2011. Bayesian nonparametric model for clustering individual co-exposure to pesticides found in the French diet. *Bayesian Analysis*. 6, 127-144.
- Dubuisson, C., Lioret, S., Touvier, M., Dufour, A., Calamassi-Tran, G., Volatier, J. L., Lafay, L., 2010. Trends in food and nutritional intakes of French adults from 1999 to 2007: results from the INCA surveys. *British Journal of Nutrition*. 103, 1035-1048.
- EFSA, (European Food Safety Agency) Opinion of the Scientific Panel on Plant protection products and their Residues on a request from the Commission on acute dietary intake assessment of pesticide residues in fruit and vegetables. *EFSA J*. 538, 1-88. <http://www.efsa.europa.eu> 2007.
- EFSA, (European Food Safety Agency) Opinion of the Scientific Panel on Plant Protection products and their Residues to evaluate the suitability of existing methodologies and, if appropriate, the identification of new approaches to assess cumulative and synergistic risks from pesticides to human health with a view to set MRLs for those pesticides in the frame of Regulation (EC) 396/2005. vol. 704. p. 1-84 2008.
- EFSA, (European Food Safety Agency) Scientific Opinion on Risk Assessment for a Selected Group of Pesticides from the Triazole Group to Test Possible Methodologies to Assess Cumulative Effects from Exposure through Food from these Pesticides on Human Health. Technical Report 7 (9). doi:10.2903/j.efsa.2009.1167 (187 pp.). Available online: www.efsa.europa.eu. , 2009.
- EFSA, (European Food Safety Agency) Annual Report on Pesticide Residues according to Article 32 of Regulation (EC) n° 396/2005. doi:10.2903/j.efsa.2010.1646. *EFSA Journal* 8, 1646. (442 pp.). Available online: www.efsa.europa.eu. 2010.
- EPA, (Environmental Protection Agency) Revised Organophosphorus Pesticide Cumulative Risk Assessment. Office of Pesticide Programs, US Environmental Protection Agency, Washington, DC., 2002.
- EPA, (Environmental Protection Agency) Revised N-Methyl Carbamate Cumulative Risk Assessment. Office of Pesticide Programs, US Environmental Protection Agency, Washington, DC. 2007.
- European Commission, Opinion on Toxicity and Assessment of Chemical Mixtures. Available online: http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/environmental_risks/docs/scher_o_150.pdf. 2011
- Ferguson, T. S., 1973. A Bayesian analysis of some nonparametric problems. *Annals of Statistics*. 1, 209-230.
- Iman, R. L., Conover, W. J., 1982. A distribution-free approach to inducing rank correlation among input variables. *Communication in Statistics*. 11, 311-334.
- Lioret, S., Dubuisson, C., Dufour, A., Touvier, M., Calamassi-Tran, G., Maire, B., Volatier, J. L., Lafay, L., 2010. Trends in food intake in French children from 1999 to 2007: results from the INCA (étude Individuelle Nationale des Consommations Alimentaires) dietary surveys. *British Journal of Nutrition*. 103, 585-601.
- Lo, A. Y., 1984. On a class of bayesian nonparametric estimates: I. Density estimates. *Annals of Statistics*. 12, 351-357.
- Meek, M. E. B., Boobis, A. R., Crofton, K. M., Heinemeyer, G., Raaij, M. V., Vickers, C., 2011. Risk assessment of combined exposure to multiple chemicals: A WHO/IPCS framework. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 60.
- Ministère de l'agriculture et de la pêche, E-phy. Le catalogue des produits phytopharmaceutiques et de leurs usages des matières fertilisantes et des supports de culture homologués en France. Available online <http://e-phy.agriculture.gouv.fr/>. Last consultation 22 February 2011. 2011.
- Müller, A. K., Bosgra, S., Boon, P. E., Voet, H. v. d., Nielsen, E., Ladefoged, O., 2009. Probabilistic cumulative risk assessment of anti-androgenic pesticides in food. *Food and Chemical Toxicology*. 47, 2951-2962.
- Reffstrup, T. K., Larsen, J. C., Meyer, O., 2010. Risk assessment of mixtures of pesticides. Current approaches and future strategies. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 56, 174-192.
- Van Audenhaege, M., Heraud, F., Menard, C., Bouyrie, J., Morois, S., Calamassi-Tran, G., Lesterle, S., Volatier, J. L., Leblanc, J. C., 2009. Impact of food consumption habits on the pesticide dietary

intake: Comparison between a French vegetarian and the general population. Food Additives and Contaminants. Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment. 26, 1372-1388.

WHO, (World Health Organization) Assessment of combined exposures to multiple chemicals: report of a WHO/IPCS international workshop on aggregate/cumulative risk assessment. 2009.

Table 1 Exposure in µg/kg BW/day to the cocktails of pesticides per group of children

Pesticide residue	Chemical family	Percentage per cocktail	Exposure of child population of group 1 699 children in µg/kg BW/day						Exposure of child population of group 2 238 children in µg/kg BW/day					
			Mean	Sd	50 th	97.5 th	99 th	Max	Mean	Sd	50 th	97.5 th	99 th	Max
Cocktail 1			+	+	+	+	+	+						
Captan	Phtalamide	3%	0.07	0.25	1.00E-7	0.50	0.94	3.71	0.14	0.16	0.08	0.61	0.80	0.95
Diphenylamine	Amine	40%	0.86	1.79	1.00E-7	6.38	8.49	17.59	1.31	1.46	0.95	4.87	6.95	10.70
Phosalone	Organophosphate	13%	0.28	0.57	3.27E-5	1.90	2.41	5.86	0.48	0.52	0.33	2.11	2.57	3.07
Propargite	Sulfite ester	42%	0.90	1.78	1.00E-7	5.67	7.51	14.02	1.58	1.83	1.03	7.29	8.48	10.18
Tolyfluanid	Sulphamide	2%	0.05	0.11	1.00E-7	0.35	0.59	1.01	0.11	0.13	0.07	0.46	0.60	0.82
Cocktail 2			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Chlorfenvinphos	Organophosphate	61%	0.06	0.12	0.01	0.41	0.60	0.86	0.08	0.19	0.01	0.45	0.60	2.02
Ethion	Organophosphate	25%	0.03	0.06	4.02E-04	0.20	0.28	0.50	0.04	0.08	1.00E-07	0.25	0.35	0.60
Linuron	Urea	14%	0.01	0.03	1.24E-03	0.09	0.15	0.22	0.02	0.04	1.40E-03	0.12	0.21	0.28
Cocktail 3														
Fenhexamid	Hydroxyanilide	-	0.36	2.44	1.00E-07	3.54	12.73	34.72	0.98	4.71	0.06	7.08	15.00	58.61
Fenitrothion	Organophosphate	-	0.00	0.00	1.00E-07	4.79E-03	0.01	0.03	0.05	0.19	1.76E-03	0.54	0.86	1.99
Penconazole	Triazole	-	0.00	0.00	1.00E-07	1.00E-07	1.00E-07	1.00E-07	2.96E-03	0.01	1.00E-07	0.04	0.08	0.11
Pyrimethanil	Anilinopyrimidine	-	0.02	0.04	4.59E-03	0.12	0.18	0.48	0.27	0.61	0.10	1.67	2.75	5.67
Quinoxifen	Quinoline	-	0.00	0.00	1.00E-07	0.00	0.00	0.00	0.01	0.03	1.00E-07	0.09	0.17	0.26
Triadimenol	Triazole	-	0.02	0.12	1.00E-07	0.21	0.59	1.74	0.05	0.13	2.18E-04	0.53	0.69	0.98

Pesticide residue	Chemical family	Percentage per cocktail	Exposure of child population of group 1						Exposure of child population of group 2					
			699 children						238 children					
			in µg/kg BW/day						in µg/kg BW/day					
			Mean	Sd	50 th	97.5 th	99 th	Max	Mean	Sd	50 th	97.5 th	99 th	Max
Cocktail 4														
Cyprodinil	Anilinopyrimidine	-	0.16	0.36	1.24E-03	1.14	1.75	3.32	0.36	0.75	0.11	2.10	3.06	7.60
Fludioxonil	Phenylpyrrole	-	0.17	0.47	1.00E-07	1.61	2.00	4.74	0.23	0.41	0.06	1.55	1.90	2.47
Iprodione	Dicarboximide	-	0.73	1.32	0.20	4.73	6.48	10.95	1.06	1.60	0.45	4.71	8.57	12.74
λ-Cyhalothrin	Pyrethroid	-	0.02	0.05	0.01	0.17	0.23	0.35	0.04	0.06	0.02	0.19	0.27	0.51
Procymidone	Dicarboximide	-	0.45	0.79	0.14	2.50	3.36	8.01	1.02	1.68	0.52	6.22	8.34	14.88
Cocktail 5									+	+	+	+	+	+
DDT	Organochlorine	95%	1.35E-03	2.98E-03	8.50E-06	0.01	0.01	0.04	2.45E-03	4.83E-03	4.63E-04	0.02	0.02	0.05
Dieldrin	Chlorinated hydrocarbon	5%	5.72E-05	1.84E-04	1.00E-07	5.23E-04	8.49E-04	2.33E-03	1.16E-04	2.71E-04	1.00E-07	9.50E-04	1.26E-03	2.27E-03
Cocktail 6			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Chlorpropham	Carbamate	26%	6.42	9.23	2.34	33.33	40.01	68.13	7.45	12.35	2.06	38.55	60.86	81.45
Maleic hydrazide	Pyridazine	74%	17.86	24.07	8.24	79.95	106.17	177.42	20.56	30.23	8.91	90.13	136.01	215.28
Cocktail 7			+	+	+	+	+	+						
Imazalil	Imidazole	97%	3.30	5.69	0.85	17.29	28.08	61.40	4.58	6.44	2.23	24.38	33.50	38.63
Methidathion	Organophosphate	3%	0.08	0.24	3.84E-03	0.58	1.18	2.68	0.14	0.28	0.03	0.96	1.42	1.98

The sign + indicates the sub-population(s) from which the cocktail has been defined

Table 2 Exposure in µg/kg BW/day to the cocktails of pesticides per group of adults

Pesticide Residue	Percentage per cocktail	Exposure of adult population of group 1						Exposure of adult population of group 2						Exposure of adult population of group 3					
		256 adults						655 adults						302 adults					
		µg/kg BW/day						µg/kg BW/day						µg/kg BW/day					
		Mean	Sd	50 th	97.5 th	99 th	Max	Mean	Sd	50 th	97.5 th	99 th	Max	Mean	Sd	50 th	97.5 th	99 th	Max
Cocktail 1																			
Captan	-	0.10	0.13	0.05	0.43	0.64	0.82	0.07	0.13	0.02	0.41	0.68	1.06	0.07	0.23	0.01	0.37	0.48	3.57
Diphenylamine	-	1.05	1.37	0.59	3.68	6.21	12.56	0.90	1.47	0.21	4.91	6.43	11.73	0.51	1.00	2.37E-03	3.45	4.46	6.41
Phosalone	-	0.31	0.37	0.18	1.12	1.46	3.61	0.28	0.39	0.12	1.34	1.72	2.48	0.18	0.32	0.01	1.25	1.53	1.85
Propargite	-	1.05	1.32	0.57	4.90	5.93	9.13	0.92	1.35	0.22	4.60	5.46	9.96	0.58	1.03	0.05	3.45	4.94	6.13
Tolyfluanid	-	0.07	0.09	0.04	0.32	0.41	0.70	0.05	0.09	0.01	0.30	0.46	0.93	0.04	0.11	3.55E-03	0.31	0.52	1.01
Cocktail 2																			
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+						
Chlorfenvinphos	61%	0.06	0.11	0.02	0.36	0.54	0.85	0.05	0.09	0.01	0.33	0.42	0.80	0.05	0.08	0.01	0.27	0.37	0.42
Ethion	25%	0.03	0.04	0.01	0.14	0.18	0.32	0.02	0.04	0.00	0.15	0.19	0.27	0.02	0.04	1.84E-03	0.12	0.19	0.41
Linuron	14%	0.01	0.03	4.18E-03	0.08	0.12	0.26	0.01	0.02	9.72E-04	0.08	0.09	0.23	0.01	0.02	2.74E-03	0.06	0.09	0.14
Cocktail 3																			
														+	+	+	+	+	+
Fenhexamid	52%	0.39	1.84	0.02	4.83	10.44	17.83	0.23	1.55	0	3.72	8.42	25.27	0.84	1.59	0.12	5.24	8.39	12.03
Fenitrothion	9%	2.00E-03	0.01	1.04E-04	0.01	0.02	0.23	1.07E-03	0.01	0	0.01	0.02	0.20	0.15	0.25	0.02	0.94	1.15	1.39
Penconazole	1%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.01	0.02	6.66E-04	0.06	0.09	0.15
Pyrimethanil	31%	0.09	0.16	0.04	0.46	0.95	1.56	0.02	0.11	3.38E-03	0.15	0.23	2.18	0.51	0.86	0.11	3.00	4.31	6.09
Quinoxifen	2%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.03	0.05	4.08E-03	0.19	0.28	0.37
Triadimenol	6%	0.01	0.03	0	0.11	0.15	0.23	0.01	0.06	0	0.08	0.30	0.81	0.09	0.16	0.02	0.60	0.74	1.03

Pesticide Residue	Percentage per cocktail	Exposure of adult population of group 1						Exposure of adult population of group 2						Exposure of adult population of group 3					
		256 adults						655 adults						302 adults					
		µg/kg BW/day						µg/kg BW/day						µg/kg BW/day					
		Mean	Sd	50 th	97.5 th	99 th	Max	Mean	Sd	50 th	97.5 th	99 th	Max	Mean	Sd	50 th	97.5 th	99 th	Max
Cocktail 4														+	+	+	+	+	+
Cyprodinil	16%	0.32	0.46	0.08	1.72	1.99	2.81	0.19	0.35	0.01	1.11	1.37	2.58	0.59	0.76	0.37	3.03	3.90	4.83
Fludioxonil	9%	0.36	0.52	0.09	1.76	2.30	3.19	0.19	0.39	0.00	1.35	1.58	2.92	0.33	0.44	0.12	1.59	1.82	1.94
Iprodione	33%	1.16	1.49	0.61	5.43	5.75	11.58	0.74	1.10	0.23	3.64	5.25	10.14	1.24	1.26	1.00	4.48	5.03	8.10
λ-Cyhalothrin	1%	0.04	0.04	0.03	0.12	0.19	0.31	0.03	0.04	0.01	0.12	0.18	0.31	0.05	0.06	0.04	0.19	0.28	0.34
Procymidone	42%	0.83	1.21	0.37	4.45	5.80	8.11	0.43	0.70	0.14	2.70	3.41	5.39	1.59	2.23	0.81	6.75	9.82	19.88
Cocktail 5		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DDT	95%	1.29E-03	1.78E-03	2.89E-04	5.77E-03	7.43E-03	7.97E-03	1.26E-03	2.29E-03	1.16E-04	0.01	0.01	0.03	1.80E-03	3.01E-03	7.47E-04	0.01	0.02	0.02
Dieldrin	5%	7.92E-05	1.80E-04	0	5.45E-04	8.35E-04	1.39E-03	6.05E-05	1.45E-04	0	5.09E-04	6.55E-04	1.25E-03	7.65E-05	1.64E-04	0	5.31E-04	6.43E-04	1.59E-03
Cocktail 6		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Chlorpropham	26%	4.77	6.29	2.71	21.94	25.44	41.11	4.28	6.26	1.70	20.34	26.73	48.08	4.22	6.14	1.11	19.08	22.87	41.79
Maleic hydrazide	74%	13.24	15.61	8.61	57.24	63.68	87.98	12.09	15.94	6.14	55.16	65.09	98.53	12.00	16.02	5.96	49.79	61.46	111.28
Cocktail 7		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Imazalil	97%	1.76	2.27	0.67	6.92	10.17	14.61	1.73	2.46	0.50	7.87	12.31	18.79	1.58	2.38	0.48	7.59	11.77	13.89
Methidathion	3%	0.05	0.08	0.02	0.30	0.38	0.68	0.05	0.14	0.01	0.37	0.58	2.11	0.04	0.09	0.01	0.32	0.45	0.53

The sign + indicates the sub-population(s) from which the cocktail has been defined

Figure 1

Children exposures of group 2 and 3 to the 79 pesticides

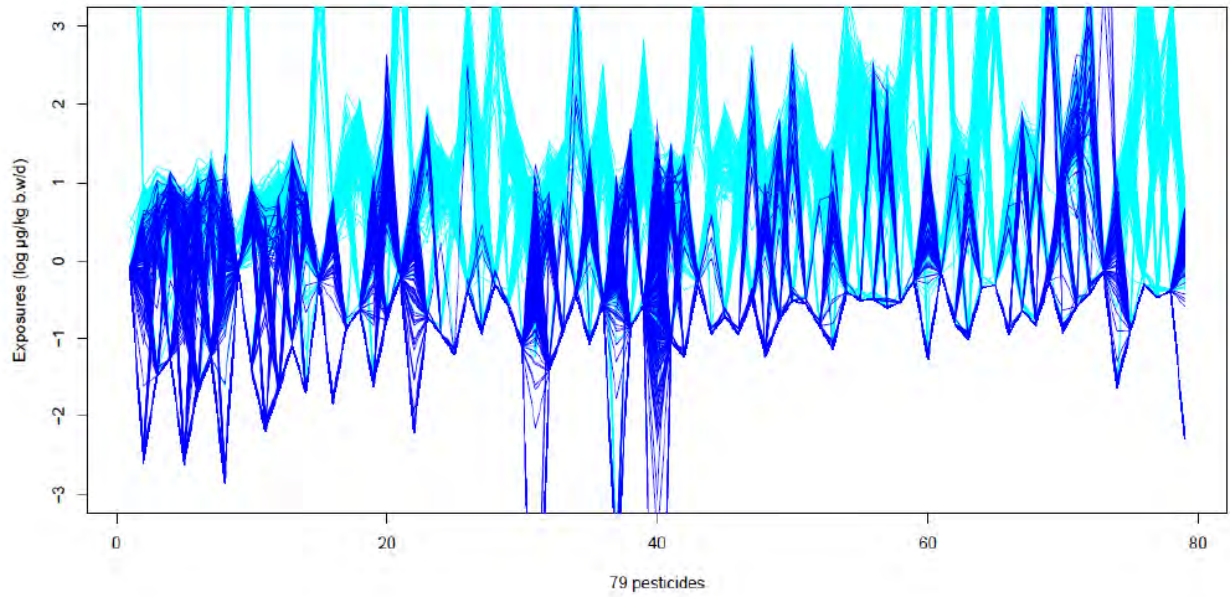


Figure 1 Parallel coordinates of the co-exposures to the 79 pesticides for two children groups obtained with the model. The light blue lines represent the co-exposures of the 238 children of group n°2 (highly exposed) and the dark blue lines represent the co-exposures of the 239 children of group n°3 (lowly exposed).

Figure 2

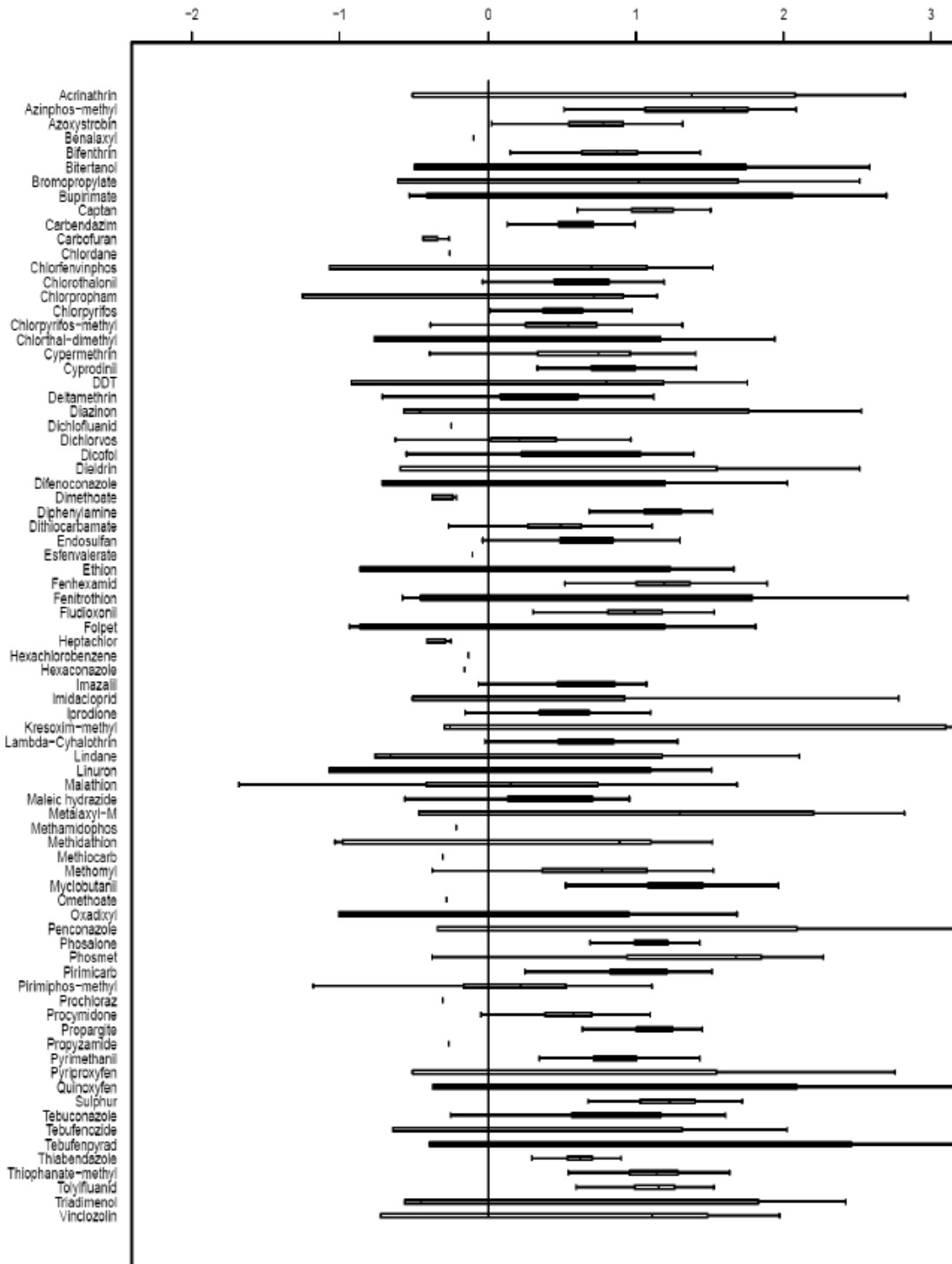


Figure 2 Box Plot of the log exposures of the 238 children of group n°2

Figure 3

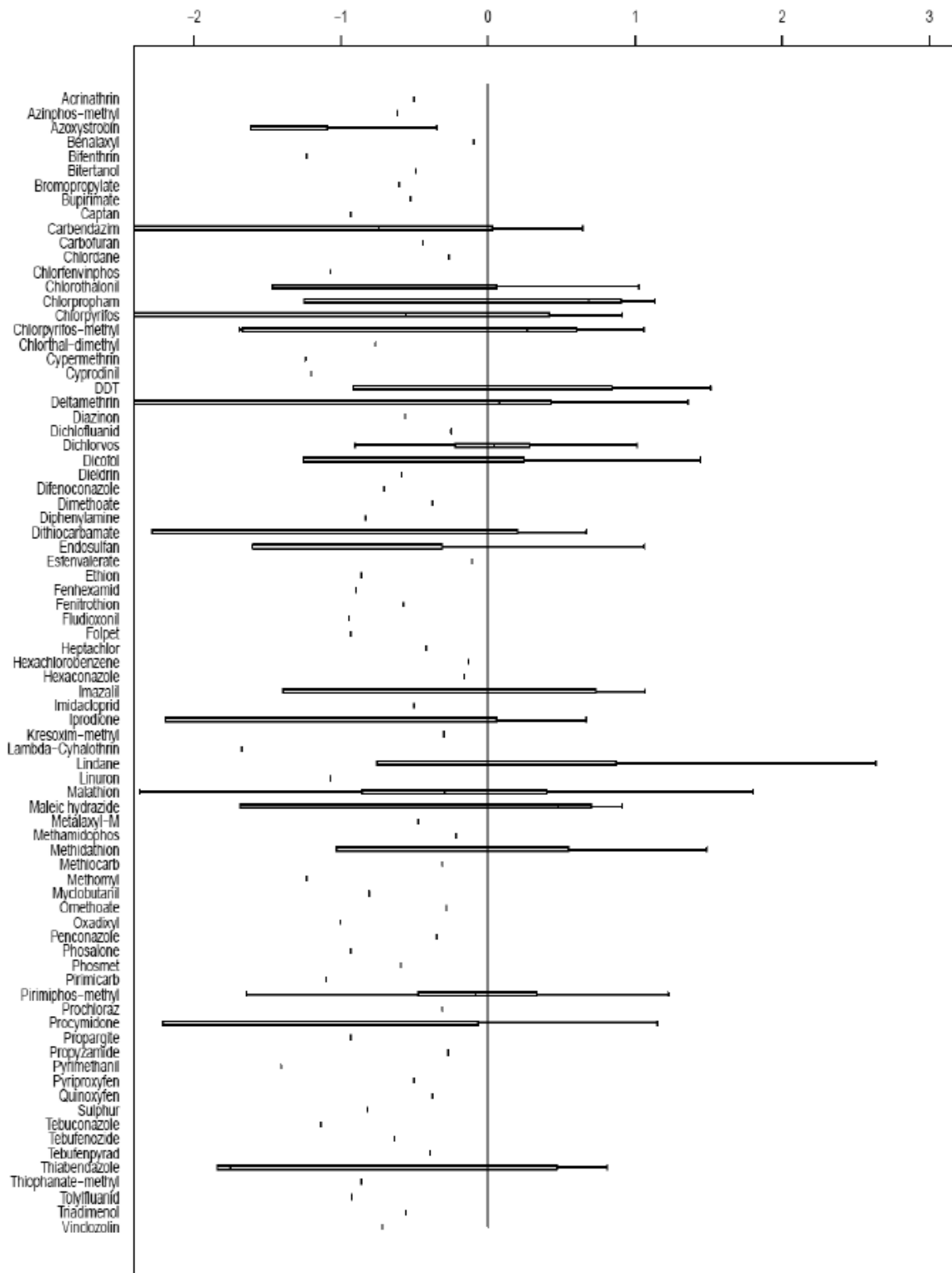


Figure 3 Box Plot of the log exposures of the 239 children of group n°3

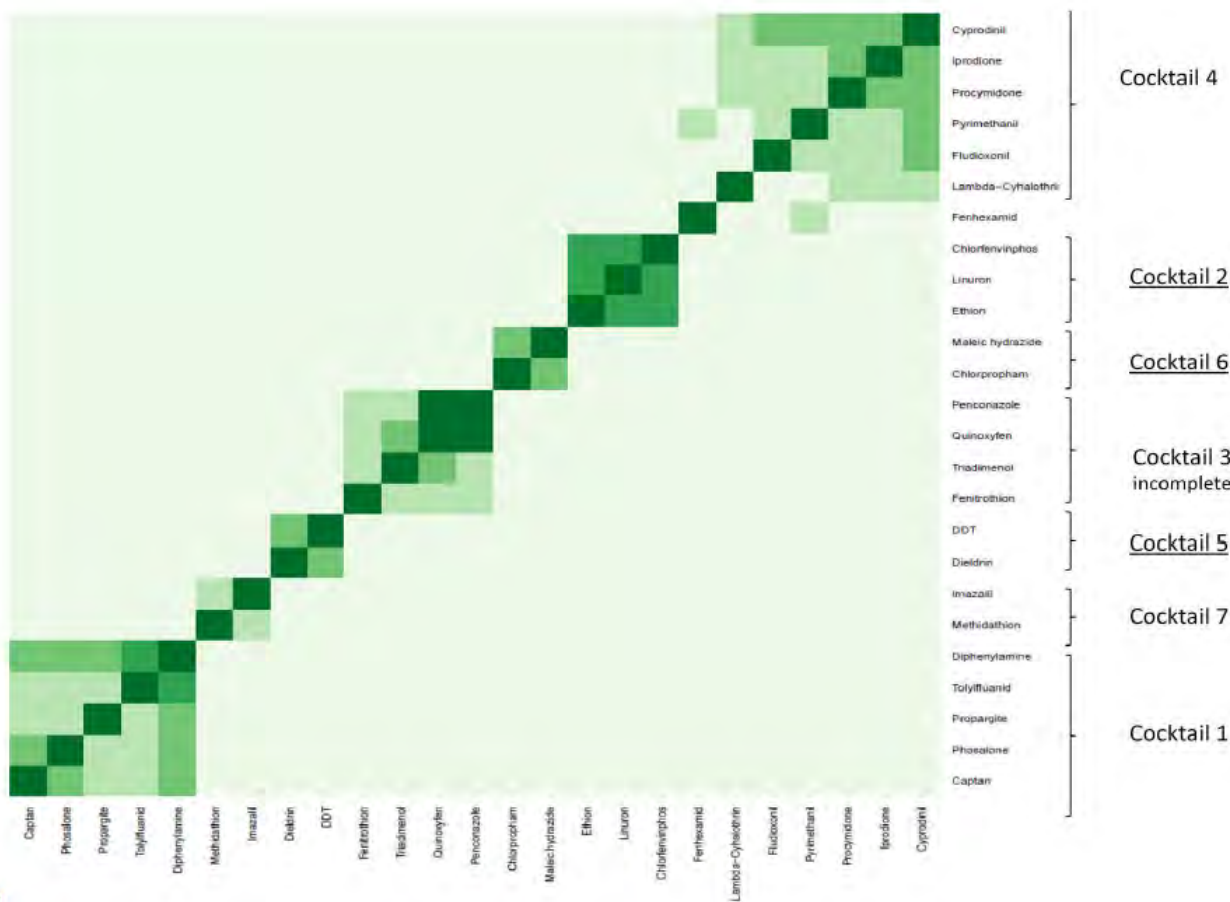


Figure 4

Figure 4 Correlations between the pesticide exposures of the 238 children of the group n°2. Underline cocktails 2, 5 and 6 result from the pesticide exposure combinations of this subpopulation. They are composed of pesticides with correlations upper than 0.7. The five greener colors indicate the different correlation levels broken as <0.5; 0.5-0.7; 0.7-0.8; 0.8-0.9; 0.9-1.

IV. Discussion

A partir de la co-exposition aiguë, des fortes corrélations entre les pesticides ont été obtenues. Ainsi, 7 mélanges constitués de 2 à 6 substances retrouvés dans l'alimentation de la population Française ont été identifiés. L'intérêt de ce modèle est également de pouvoir obtenir à partir des expositions de la population, les proportions de chaque composé du mélange.

Le choix des études de consommations et les bases de données sur la contamination des aliments sont des facteurs importants pour ne pas sous- ou surestimer l'exposition de la population. En fonction du choix des données à inclure dans l'étude, les teneurs auxquelles la population Française est exposée, ainsi que les types de pesticides retrouvés peuvent être différents (exemple des données de censures). Par ailleurs, la recherche de contaminants a été effectuée sur des denrées brutes et quelques produits transformés, et ne tiennent pas compte du process, ce qui peut lors de l'évaluation de l'exposition, surévaluer les valeurs d'exposition aux contaminants. En effet par exemple dans le cas des pesticides, toutes les étapes de transformation des aliments, (lavage, épluchage, cuisson des aliments) réduit de façon significative la teneur en résidus de pesticides dans les aliments (Kaushik et al. 2009; Soliman 2001; Uygun et al. 2009). Dans cette étude, nous avons fait le choix de prendre en compte les valeurs de contamination telles quelles, sans appliquer de facteurs de process conseillés lors de l'évaluation du risque par les rapports de l'EFSA. Dans l'exemple du cocktail 7, (constitué de l'imazalil et du methidathion), dont les principaux aliments contributeurs sont les agrumes, les pesticides sont essentiellement concentrés dans la peau et sont très peu retrouvés dans la pulpe qui est consommée (EFSA 2010b; EFSA 2010c). Il est alors recommandé dans ces deux rapports de tenir compte d'un facteur de process dans l'évaluation du risque. Sur les 25 pesticides identifiés dans cette étude, 7 sont retrouvés dans l'étude menée par l'association Générations Futures et le réseau Européen HEAL en 2010 (iprodione, fludioxonil, λ -cyhalothrine, dieldrine, DDT, imazalil, fenhexamid) (Génération futures 2010) et 19 dans l'étude de l'EAT2, dont l'imazalil (ANSES 2011a). Ces deux études ont été menées en tenant compte des habitudes du consommateur, c'est-à-dire que les analyses ont été effectuées sur des aliments « tels que consommés », en tenant compte du process. Si l'on examine l'étude EAT2, on peut voir que les teneurs retrouvées de ces composés sont faibles, ce qui se traduit également par une valeur d'exposition plus faible que l'étude de la co-exposition. L'étude EAT2 nous indique alors que la plupart des teneurs en résidus peuvent être réduits grâce au process.

Dans le cadre de l'étude de la génotoxicité de ces mélanges, nous tenons compte uniquement de la proportion de chaque pesticide dans ce mélange. Les mélanges sont soit testés en proportions équimolaires, soit en tenant compte des proportions obtenues par la méthode statistique. La surestimation des quantités de ces deux pesticides ingérés n'est alors pas un facteur influençant l'étude de la génotoxicité.

Un autre point pouvant être critiquable concerne le calcul de la co-exposition : dans l'étude INCA2, les aliments tels que consommés ont été fractionnés en denrées brutes à l'aide d'une table de conversion. Les recettes créées à partir des 1280 aliments répertoriés, peuvent également sous- ou surévaluer l'exposition puisqu'il s'agit de moyenne de proportions de denrées.

Pour avoir une évaluation de l'exposition plus précise, l'idéal serait de pouvoir analyser les contaminants alimentaires en même temps que les études de consommation, à l'aide de repas dupliqués (ANSES 2011a; Noel et al. 2003). Ces études étant difficiles à mettre en place, en raison des coûts engendrés par les analyses, il est conseillé de passer par les bases de données.

Les fortes corrélations entre les pesticides montrent par exemple des associations de plusieurs substances actives dans de nombreuses préparations. C'est le cas du cyprodinil et du fludioxonil, qui sont présents dans le mélange 4, et présents ensemble dans des préparations phytosanitaires telles qu'ADIRCIF, SWITCH (base de données du ministère de l'agriculture e-phy : <http://e-phy.agriculture.gouv.fr>). Avec notre modèle statistique, le calcul des proportions estimées retrouvées dans le mélange indique que le fludioxonil est présent en plus faible quantité par rapport au cyprodinil (Tableau 6), ce qui est en adéquation avec les proportions de ces deux pesticides présents dans ces préparations (base de données du ministère de l'agriculture e-phy).

Chapitre IV :

Etude in vitro du potentiel génomotoxique des sept mélanges de pesticides

Le but dans cette partie est de déterminer dans un premier temps le potentiel génotoxique des sept mélanges de pesticides en utilisant le test γ -H2AX (Chapitre I paragraphe IV D). Dans un deuxième temps pour le mélange qui s'est révélé être génotoxique, les mécanismes de génotoxicité mis en jeu sont déterminés. Enfin, les substances seules sont testées afin d'observer un potentiel effet du mélange. Le potentiel génotoxique a été testé sur les quatre lignées cellulaires humaines présentées précédemment (HepG2, LS174T, ACHN, et SH-SY5Y (Chapitre II)). Les cellules ont été traitées pendant 24 h avec 5 concentrations des sept mélanges en proportions équimolaires. Par ailleurs, le modèle statistique permet d'avoir la proportion de chaque composé dans le mélange. Le mélange génotoxique a ensuite été testé en tenant compte des proportions retrouvées dans l'alimentation (Tableau 6).

		Répartition équimolaire	Proportions estimées à partir du calcul d'exposition
Mélange 1	Diphenylamine	20%	40%
	Tolyfluanid	20%	2%
	Phosalone	20%	13%
	Propargite	20%	42%
	Captan	20%	3%
Mélange 2	Linuron	33,3%	14%
	Chlorfenvinphos	33,3%	61%
	Ethion	33,3%	25%
Mélange 3	Fenitrothion	16,7%	9%
	Quinoxyfen	16,7%	2%
	Fenhexamid	16,7%	52%
	Triadimenol	16,7%	6%
	Pyrimethanil	16,7%	31%
	Penconazole	16,7%	1%
Mélange 4	Lambda-Cyhalothrine	20%	1%
	Iprodione	20%	33%
	Procymidone	20%	42%
	Cyprodinil	20%	16%
	Fludioxonil	20%	9%
Mélange 5	DDT	50%	95%
	Dieldrin	50%	5%
Mélange 6	Maleic hydrazide	50%	74%
	Chlorpropham	50%	26%
Mélange 7	Imazalil	50%	97%
	Methidathion	50%	3%

Tableau 6 : liste des 7 mélanges de pesticides faisant l'objet de tests génotoxiques et proportions de chaque pesticide dans le mélange.

Article 2

Research Article

Genotoxicity of Pesticide Mixtures Present in the Diet of the French Population

Vanessa Graillot,^{1,2,3} Natsuko Takakura,⁴ Ludovic Le Hegarat,⁴ Valerie Fessard,⁴ Marc Audebert,^{1,2*} and Jean-Pierre Cravedi^{1,2}

¹INRA, UMR 1331, Toxalim, Research Centre in Food Toxicology, F-31027 Toulouse, France

²Université de Toulouse, INP, ENVT, EIP, UPS, UMR 1331, Toxalim, F-31076 Toulouse, France

³ANSES, French Agency for Food, Environmental and Occupational Health Safety, 27-31 Avenue du Général Leclerc, F-94701 Maisons-Alfort, France

⁴ANSES, French Agency for Food, Environmental and Occupational Health Safety, Unité de Toxicologie des Contaminants, F-35302 Fougeres, France

Consumers may be simultaneously exposed to several pesticide residues in their diet. A previous study identified the seven most common pesticide mixtures to which the French population was exposed through food consumption in 2006. The aim of this study was to investigate if the seven mixtures are potentially cytotoxic and genotoxic and if so, whether compounds in a same mixture have a combined effect. The cytotoxicity and genotoxicity of the seven mixtures were investigated with a new assay (γ -H2AX) using four human cell lines (ACHN, SH-SY5Y, LS-174T, and HepG2). Mixtures were tested at equimolar concentrations and also at concentrations reflecting their actual proportion in the diet. Irrespective of the cell line tested, parallel cytotoxicity of the seven mixtures was observed. Only one mixture was genotoxic for the HepG2 cells at concentra-

tions = 3 μ M in equimolar proportion and at 30 μ M in actual proportion. Caspase 3/7 activity, the comet assay, and reactive oxygen species production were also investigated using the same mixture and HepG2 cells. Our results suggest that pesticide metabolites from the mixture generated by HepG2 cells were responsible for the observed damage to DNA. Among the five compounds in the genotoxic mixture, only fludioxonil and cyprodinil were genotoxic for HepG2 cells alone at concentrations = 4 and 20 μ M, respectively. Our data suggest a combined genotoxic effect of the mixture at low concentrations with a significantly higher effect of the mixture of pesticides than would be expected from the response to the individual compounds. *Environ. Mol. Mutagen.* 00:000–000, 2012. © 2012 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: mixture of pesticides; genotoxicity; γ -H2AX; human cell lines

INTRODUCTION

Consumers may be exposed to different pesticide residues in their food every day. The European Food Safety Authority (EFSA) reported that pesticide residues were detected in 46.7% of the food samples analyzed throughout the European Union in 2008. Residues of at least two pesticides were found in 27% of the samples analyzed, among which one-third contained residues of more than four pesticides [EFSA, 2010]. Yet the risk assessment of pesticides for humans is based on the hazard characterization of individual active compounds, without taking possible combined effects of multiple residues in the diet into account. Today, more than 300 active substances are used to protect crops.

A large number of studies have been published on the likely harmful effects of pesticides for human health.

Among them, the possible link between exposure to pesticides and cancer has received particular attention. Although many of the authors linked DNA damage [Bolognesi et al., 2011] or cancer [Weichenthal et al., 2010] to occupational exposure to plant protection products, only limited evidence exists regarding the risk for

Grant sponsor: The French "Agence Nationale pour la Recherche"; Grant Number ANR PERICLES- n° 2008-CESA 01601.

*Correspondence to: Marc Audebert, Ph.D, INRA-UMR1331, Toxalim, 180 chemin de Tournefeuille BP 93173, 31027 Toulouse Cedex 3, France. E-mail: marc.audebert@toulouse.inra.fr

Received 12 August 2011; provisionally accepted 28 November 2011; and in final form 29 November 2011

DOI 10.1002/em.21676

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

TABLE I. Active Substances Present in Each Mixture

Mixtures tested	Active substance	Category	Proportion reflecting observed exposure (%)
Mixture 1	Diphenylamine	PG	40
	Tolylfluamid	FU, AC	2
	Phosalone	IN, AC	13
	Propargite	AC	42
	Captan	FU	3
Mixture 2	Linuron	HB	14
	Chlorfenvinphos	IN	61
	Ethion	IN, AC	25
Mixture 3	Fenitrothion	IN, AC	9
	Quinoxifen	FU	2
	Fenhexamid	FU	52
	Triadimenol	FU	6
	Pyrimethanil	FU	31
Mixture 4	Penconazole	FU	1
	λ -Cyhalothrin	IN	1
	Iprodione	FU, NE	33
	Procymidone	FU	42
	Cyprodinil	FU	16
Mixture 5	Fludioxonil	FU	9
	DDT	IN	95
	Dieldrin	IN	5
Mixture 6	Maleic hydrazide	PG	74
	Chlorpropham	PG, HB	26
Mixture 7	Imazalil	FU	97
	Methidathion	IN, AC	3

AC, acaricide; FU, fungicide; HB, herbicide; IN, insecticide; NE, nematocidal; PG, plant growth regulator.

the general population through the consumption of contaminated food. Yet, exposure to pesticide mixtures is suspected to present a risk for human health [EFSA, 2008].

A statistical method was recently developed to identify the main mixtures of pesticides in the French diet [Crepet and Tressou, 2011]. Coexposure to different pesticides was determined using data on food contamination by pesticides in France in 2006 [Crepet and Tressou, 2011], and data on French food consumption during the same period [Lioret et al., 2011]. A statistical model was used to define groups of individuals with similar patterns of exposure to pesticides [Crepet and Tressou, 2011]. Using data concerning highly exposed subgroups, the correlations between exposure to individual pesticides resulted in the identification of seven different mixtures of pesticides (Table I) consisting, in all, of 25 different compounds [Crepet et al., submitted].

Several genotoxic *in vitro* and *in vivo* assays such as the comet assay, micronucleus and chromosome aberration assays are currently used to detect damage to DNA. In addition to fulfilling repeatability and reproducibility criteria, genotoxicity tests used in regulatory toxicology studies must be both sensitive and suitable for high-throughput screening. Among different types of DNA damage, DNA double strand-breaks (DSB) are the most deleterious to the cells, potentially resulting in a carcinogenesis process if the damage is not repaired appropri-

ately [Khanna and Jackson, 2001]. After DNA DSB by a physical or chemical agent, a cell signaling pathway is set in motion, resulting in the phosphorylation of histone H2AX, called γ -H2AX. This early and sensitive marker is produced by various types of DNA damage (DNA adduct, DNA double-strand break, DNA replication or transcription blocking lesions) [Sedelnikova et al., 2010]. It has also been established that oxidative stress can lead to phosphorylation of histone H2AX [Tanaka et al., 2006], that micronucleus formation is correlated with H2AX phosphorylation [Yoshikawa et al., 2009] and that γ -H2AX is a good biomarker of pre-cancerous cells *in vivo* [Bartkova et al., 2005; Gorgoulis et al., 2005]. All these data support the hypothesis that H2AX phosphorylation is an appropriate biomarker of genotoxicity as suggested by recent *in vitro* studies [Zhou et al., 2006; Watters et al., 2009; Audebert et al., 2010; Matsuzaki et al., 2010; Audebert et al., 2011].

Because *in vitro* cell models only express part of the metabolic capabilities expressed in the tissue they originate from, and display different sensitivity to toxic compounds, xenobiotic effects need to be tested using a wide range of cell lines [Huang et al., 2008; Xia et al., 2008].

In this study, the cytotoxic and genotoxic effects of seven pesticide mixtures present in the French diet were investigated. In addition, if a mixture was shown to be positive in the genotoxicity assay, its effect was compared with the effects of the individual compounds that made up the mixture. Four human cell lines (ACHN, SH-SY5Y, LS-174T, and HepG2), originating from potential target tissues of food contaminants (kidney, nerve, colon and liver, respectively) were used. The γ -H2AX assay based on the In Cell Western technique was used to screen the effects of a mixture and of its individual components [Audebert et al., 2010, 2011].

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and Cell Culture Media Supplements

All pesticides (purity > 98%), benzo[*a*]pyrene (B[a]P), etoposide and staurosporin from *Streptomyces* sp. were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Falavier, France) and diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO) also obtained from Sigma-Aldrich. Potassium bromate (KBrO₃) was purchased from Acros Organics (NJ). The antibiotics (penicillin and streptomycin), trypsin, PBS, RNase A (from bovine pancreas), and Triton X-100 were also purchased from Sigma-Aldrich. The phosphatase inhibitor cocktail tablets ("PHOSSTOP") were from Roche. The blocking solution (Maxblock Blocking Medium) was from Active Motif (Belgium).

Antibodies

Primary Antibodies

Anti-phospho-H2AX from rabbit was diluted 1/200 in PBS containing 2% fetal bovine serum (FBS) and 0.2% Triton X-100 (PST buffer). Antibodies against targets from the DNA damage signaling pathway

(anti-phospho-p53 from mouse, anti-p21 Waf1/Cip1 from rabbit, anti-phospho-cdc2 from rabbit, and anti-phospho-p38 MAPK from rabbit) were diluted 1/10 in PST buffer. All primary antibodies were purchased from cell signaling technology (Danvers, MA).

Secondary Antibodies

Goat anti-rabbit antibody and goat anti-mouse antibody coupled with 770-nm fluorophore (diluted 1/1000 in PST buffer) were purchased from Biotium (CA) and TO-PRO-3 iodide (diluted 1/500 in PST) from Molecular Probes (Eugene, OR).

Cells Lines and Maintenance

HepG2 human hepatoblastoma cells (ATCC N° HB-8065), ACHN human renal adenocarcinoma cells (ATCC N° CRL-1611) and LS-174T human epithelial colorectal adenocarcinoma cells (ATCC N° CL-188) were grown in α MEM medium supplemented with 10% FBS, 100 U ml⁻¹ penicillin and 100 μ g ml⁻¹ streptomycin in a humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37°C. SH-SY5Y human neuroblastoma cells were routinely maintained in DMEM/F12 medium supplemented with 10% FBS, 100 U ml⁻¹ penicillin and 100 μ g ml⁻¹ streptomycin in a humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37°C. SH-SY5Y cells were kindly provided by Dr JM Zajac (IPBS-CNRS-UMR 5089, Toulouse, France).

Pesticide Treatment

For the HepG2, ACHN, LS-174T and SH-SY5Y cell lines, 2.6×10^4 , 4×10^4 , 3.2×10^4 , and 4×10^4 cells per well, respectively, were grown in 96-well plates containing 200- μ L medium per well. After 24 hr, the medium was replaced by 90 μ L of medium without serum. The mixtures of pesticides or the single compound diluted in 10 μ L of medium without serum were added. The concentration of the stock solutions was 50 mM in DMSO. Cells were exposed to 0.2% (v/v) DMSO in the culture medium. Cells were incubated for 24 hr at five concentrations (1, 3, 10, 30, and 100 μ M) of pesticide mixture at equimolar concentration or at concentrations reflecting their actual proportion in the French diet. For the kinetics, cells were exposed to the pesticide mixtures for from 30 min to 24 hr. Individual compounds in pesticide mixture 4 were assayed at the same concentrations as in the mixture at equimolar concentration (i.e., 0.2, 0.6, 2, 6, 20 μ M for λ -cyhalothrin, iprodione, procymidone, cyprodinil, fludioxonil).

Cell Viability

Cell viability was first determined using the methyl thiazol tetrazolium bromide (MTT) assay. After 24 hr of treatment in duplicate, the cells were incubated with the MTT solution (5 mg mL⁻¹) for 30 min at 37°C. The resulting formazan crystals were dissolved in 100- μ L DMSO at room temperature for 5 min in the dark, and absorbance was read at 570 nm using an INFINITE200 plate reader (TECAN). The percentage of cytotoxicity was determined by comparing their optical density with the control vehicle (DMSO). Experiments were carried out independently in triplicate.

In Cell Western (ICW)

The In Cell Western technique was previously shown to allow the determination of cell viability concomitantly to genotoxicity [Audebert et al., 2010]. So the method was used for the screening of mixtures, the kinetics study and the assay of single compounds. Briefly, after treatment with a pesticide mixture or a single compound in duplicate, cells were washed with PBS, and fixed in the well with 4% paraformaldehyde (electron microscopy science) for 20 min. The paraformaldehyde was then neutralized with 20-mM NH₄Cl for 2 min and washed with PBS for 5 min. Cells were permeabilized with 0.2% Triton X-100 in PBS for 5 min and washed with PST buffer. Cells were blocked with MAXblock Blocking Medium with PHOSSTOP and RNase A (0.1 g l⁻¹) for 60 min at room temperature,

TABLE II. Cytotoxicity of Pesticide Mixtures Assessed by MTT and ICW Assays on HepG2 Cell Lines Exposed to the Mixture for 24 h

	Concentrations (μ M)	MTT assay (%)	ICW assay (%)
Mixture 1	1	99 \pm 6	105 \pm 22
	3	68 \pm 6	67 \pm 8
	10	65 \pm 5	56 \pm 11
	30	34 \pm 8	12 \pm 2 **
Mixture 2	100	13 \pm 4	16 \pm 4
	1	93 \pm 14	108 \pm 10
	3	94 \pm 9	106 \pm 17
	10	101 \pm 16	95 \pm 11
Mixture 3	30	86 \pm 8	54 \pm 10 **
	100	80 \pm 4	46 \pm 11 **
	1	91 \pm 5	103 \pm 13
	3	94 \pm 8	99 \pm 16
Mixture 4	10	100 \pm 13	97 \pm 7
	30	83 \pm 8	47 \pm 8 **
	100	76 \pm 10	32 \pm 8 **
	1	100 \pm 5	104 \pm 6
Mixture 5	3	99 \pm 6	98 \pm 8
	10	94 \pm 6	94 \pm 9
	30	108 \pm 11	57 \pm 4 **
	100	72 \pm 24	46 \pm 12 **
Mixture 6	1	105 \pm 9	103 \pm 12
	3	107 \pm 11	99 \pm 16
	10	113 \pm 18	93 \pm 15
	30	52 \pm 16	46 \pm 12
Mixture 7	100	24 \pm 12	25 \pm 15
	1	90 \pm 12	104 \pm 13
	3	90 \pm 8	104 \pm 14
	10	90 \pm 9	97 \pm 12
Mixture 8	30	99 \pm 11	92 \pm 6
	100	96 \pm 8	88 \pm 8
	1	92 \pm 7	93 \pm 1
	3	98 \pm 25	87 \pm 6
Mixture 9	10	94 \pm 13	93 \pm 9
	30	65 \pm 3	51 \pm 3 *
	100	60 \pm 4	47 \pm 4

Cell viabilities are expressed as percentages and represent means \pm SD from three independent experiments. Significant differences are noted * ($P \leq 0.05$) and ** ($P \leq 0.01$).

followed by incubation with the primary antibody in PST buffer for 2 h. After three 5-min washes in PST, secondary detection was carried out using an infrared fluorescent dye conjugated antibody absorbing at 780 nm. For DNA labeling, TO-PRO-3 iodide in PST was used in combination with the secondary antibody. After 1 hr of incubation and three 5-min washes in PST, the DNA and the γ -H2AX or the DNA damage signaling pathway were simultaneously visualized using an Odyssey Infrared Imaging Scanner (Li-Cor ScienceTec, Les Ulis, France) with the 680 nm and the 800 nm fluorophore. Relative fluorescent units for γ -H2AX per cell (as determined by γ -H2AX divided by DNA content) were divided by the fluorescence per cell of the control vehicles to determine the modification in H2AX phosphorylation compared with the control. For cytotoxicity determination, the DNA content recorded in the different experiments was compared with the DNA content in the control vehicle treatment. All experiments were carried out independently in triplicate. Genotoxicity was considered as effective if the compound or mixture tested resulted in a viability > 80% and the induction of H2AX phosphorylation was at least 20% higher than in the control. The positive controls used in each treatment were 1 μ M benzo[a]pyrene for LS-174T and HepG2 cell lines, and 1 μ M etoposide for ACHN and SH-SY5Y cell lines.

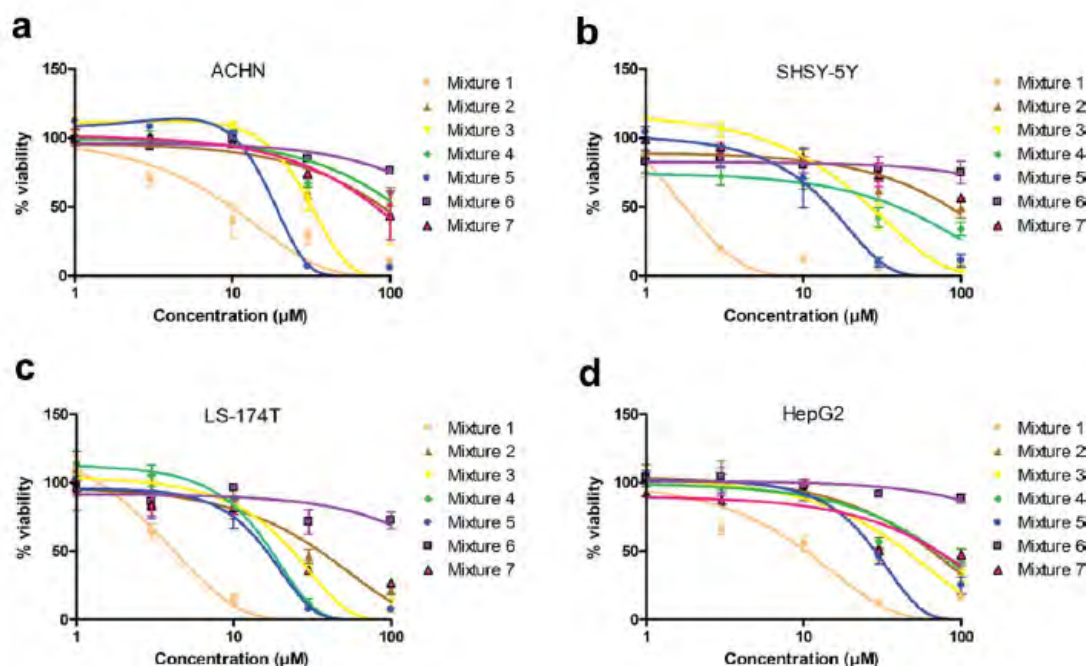


Fig. 1. Measurement of cytotoxicity using the ICW technique. Screening of seven pesticide mixtures on ACHN (a), SH-SY5Y (b), LS-174T (c) and HepG2 (c) cell lines after 24 hr of treatment. Each value represents the mean \pm SD ($n = 3$). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

Comet Assay

The HepG2 cells were seeded 24 hr before treatment at 2.1×10^5 cells per well in 24-well plates. After treatment with pesticides or with $5 \mu\text{g/ml}$ B[a]P (positive control) in FBS-free medium for 24 hr, the cells were trypsinized and collected by centrifugation at 252 g for 2 min. Cell pellets were suspended in a prewarmed low-melting point agarose (0.5% in PBS) and dropped on conventional microscope slides precoated with normal agarose (0.8% in PBS). The slides were incubated for 1 hr at 4°C in a lysis solution (2.5 M NaCl, 0.1 M EDTA, and 10 mM Tris-HCl, pH 10), extemporarily added with 10% DMSO and 1% Triton X-100. DNA was unwound for 40 min in fresh electrophoresis buffer (0.3 M NaOH, 1 mM EDTA, pH 13), before electrophoretic migration (24 min, 0.7 V/cm, 300 mA) performed at room temperature. After a neutralizing step (0.4 M Tris-HCl, pH 7.5), the slides were dried with 95% ethanol before being stored. DNA was stained with propidium iodide ($2.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ in PBS) just before slide examination with a fluorescence microscope (Leica DMR; Leica, Wetzlar, Germany) equipped with a CCD-200E video camera. At least 100 images per concentration were analyzed using Comet Assay IV software (Perceptive Instruments, Haverhill, UK). DNA damage to individual cells was expressed as a percentage of DNA in the comet tail.

Caspase-3/7 Activity

Caspase-3/7 activity was measured using the Apo-ONE Homogeneous Caspase-3/7 assay (Promega) according to the manufacturer's instructions. After 24 hr of treatment with pesticides or with 1-mM KBrO_3 (positive control) in FBS-free medium, the caspase-3/7 substrate Z-DEVD-R110 was added and the reaction allowed to continue for 90 min. Fluorescence was measured using excitation and emission wavelengths of 485 and 520 nm, respectively.

Reactive Oxygen Species Quantification

Intracellular levels of reactive oxygen species (ROS) production were determined spectrophotometrically using the non-fluorescent probe DCFH-DA, according to previously described methods [Osseni et al., 1999] with minor modifications. After 24 hr of subculture, cells were incubated with $20 \mu\text{M}$ DCFH-DA in PBS for 30 min at 37°C in the dark. Excess DCFH-DA was removed and rinsed with PBS, cells were treated for 24 hr with the pesticides, 1 mM KBrO_3 (positive control) or 0.2% of DMSO (control vehicle) in serum-free medium. Fluorescence intensity was measured using a spectrophotometer (Fluostar Optima, BMG Labtech) with excitation at 485 nm and emission at 520 nm.

Statistical Analysis

Group values of each experiment were compared with the level of significance set at $P < 0.05$ using Student's *t*-test. Statistical analysis was performed using R Software.

RESULTS

Cytotoxicity and Genotoxicity of Seven Pesticide Mixtures

The seven pesticides mixtures identified in the French diet in 2006 [Crepet et al., submitted] are listed in Table I. They consisted in a combination of 25 active substances, 14 of which are currently registered for use whereas 11 are now banned or excluded from the official list of authorized compounds. Banned pesticides included in this

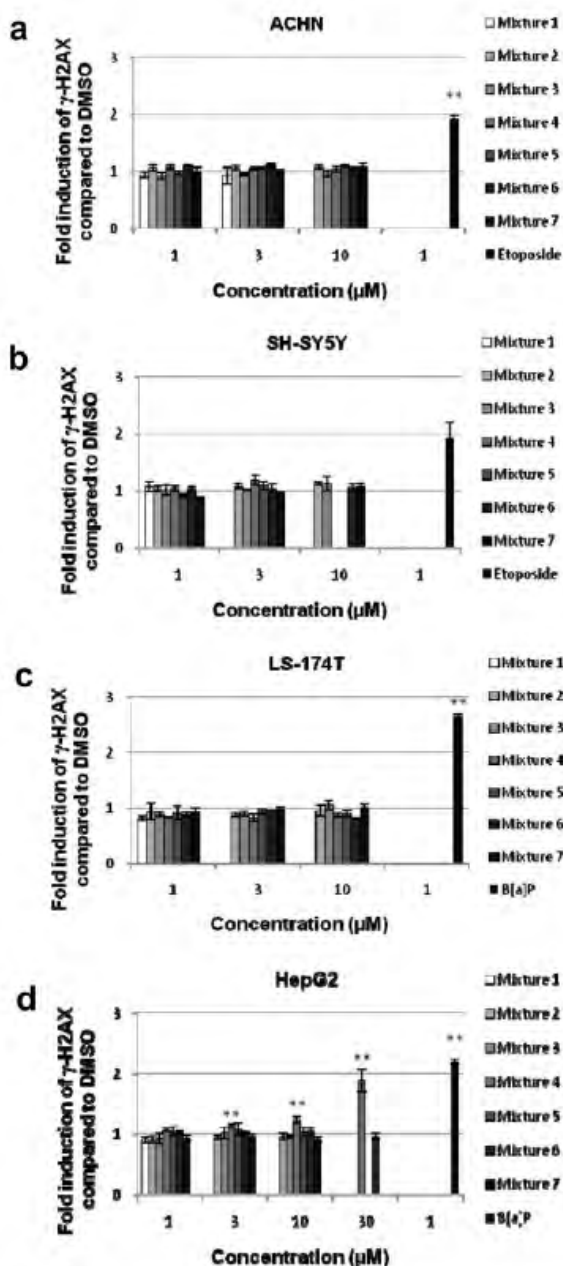


Fig. 2. ICW of γ -H2AX on ACHN (a), SH-SY5Y (b), LS-174T (c) and HepG2 (d) cell lines. Each value represents the mean \pm SEM ($n = 3$) after 24 hr of treatment with the pesticide mixtures. Significant differences were observed between DMSO controls and matched groups (* $P = 0.05$, ** $P = 0.01$).

study are persistent organic pollutants (e.g., DDT, dieldrin). Most pesticide categories (acaricides, fungicides, herbicides, insecticides, nematicides, and plant growth regulators) were represented in the seven pesticide mixtures analyzed.

In the first step, the cytotoxicity of the seven mixtures was tested on the HepG2 cell line. Two cytotoxic assays were performed (MTT and ICW) to compare the sensitivity of the two techniques [Audebert et al., 2010, 2011]. After 24 hr of treatment with the pesticide mixture at equimolar concentrations of each compound, results showed that ICW was the most sensitive technique for determining cytotoxicity (Table II). In all subsequent experiments in this study, cytotoxicity was determined using this technique.

In the second step, the cytotoxicity of the seven mixtures of pesticides was determined on ACHN, SH-SY5Y, and LS-174T human cell lines using ICW (Fig. 1). Irrespective of the cell lines tested, parallel cytotoxicity of the seven mixtures was observed: mixtures 1, 5, and 3 were the most cytotoxic and mixtures 2, 4, 6, and 7 were less toxic irrespective of the cell lines tested. SH-SY5Y and LS-174T cell lines were most sensitive to the cytotoxicity of the pesticide mixtures (Fig. 1).

We screened the genotoxicity of the seven pesticide mixtures at equimolar concentrations on the four cell lines using a new genotoxic assay based on histone H2AX phosphorylation (Fig. 2). No significant statistical γ -H2AX induction > 20% of the control without high cytotoxicity to the cells (> 60% viability) was observed with the seven mixtures on ACHN, SH-SY5Y or LS-174T cell lines (Figs. 2a–2c). On HepG2 cells, only pesticide mixture 4 produced a significant dose-dependent induction of γ -H2AX between 3 and 30 μ M after 24 hr of exposure to sub-toxic concentrations (< 60% viability) (Fig. 2d). Because γ -H2AX is an early marker of DNA damage, the time course of the genotoxic effects of mixture 4 in HepG2 cells (30 min to 24 hr) was investigated. The first detectable γ -H2AX signal appeared at \sim 8 hr of exposure, which was about the same period of time required with the B[a]P treatment (Fig. 3).

Cell Signaling Disturbance by Mixture 4 on HepG2 Cells

To confirm that the observed H2AX phosphorylation was strictly due to a genotoxicity effect of mixture 4 and not to DNA fragmentation by apoptosis, a caspase assay was performed on HepG2 cells. At low concentrations (1–30 μ M), caspase 3/7 activity did not increase significantly after 24 hr (Fig. 4a), indicating that the DNA alterations were due to genotoxicity rather than to apoptosis. However, at 100 μ M, a significant apoptotic response was observed in accordance with the high level of cytotoxicity (46% viability) previously measured at this concentration (Table II).

We further investigated if the production of oxidative stress could be responsible for the observed genotoxic effect of mixture 4 on HepG2 cells (Fig. 2d and 3). Because the comet assay is sensitive to DNA damage,

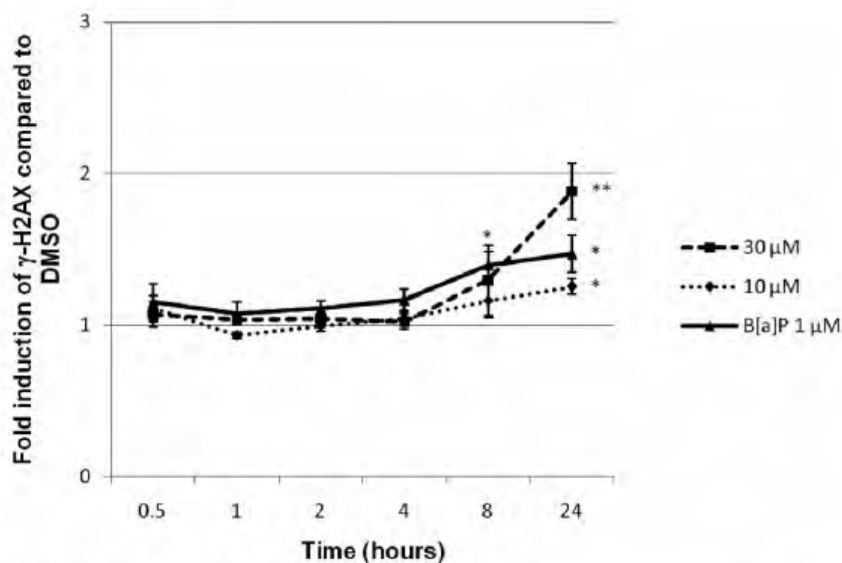


Fig. 3. Time course study of phosphorylation of H2AX on the HepG2 cell line treated for 24 hr with pesticide mixture 4. The positive control was B[a]P at 1 μ M. Each value represents the mean \pm SEM ($n = 4$). Significant differences were observed between DMSO controls and matched groups (* $P = 0.05$).

and notably to damage caused by oxidative stress, we performed the comet assay on HepG2 cells after treatment with mixture 4 for 24 h. After treating cells with 10, 30, and 100 μ M of mixture 4 at equimolar concentrations of each pesticide, the extent of DNA damage in individual cells was evaluated by the percentage of tail DNA (Fig. 4b). B[a]P treated cells showed a clear genotoxic response in comparison with the control vehicle cells. Whatever the dose tested, mixture 4 did not significantly increase the percentage of tail DNA. We also measured the production of ROS after treatment with mixture 4. Whatever the dose tested, mixture 4 did not generate ROS (Fig. 4c). All these data imply that the genotoxicity of pesticide mixture 4 on HepG2 cells was not related to the production of ROS.

The cell signaling disturbance induced by mixture 4 was then investigated on HepG2 cells. For this purpose, different targets of the DNA damage cellular signaling pathway were investigated. Phospho-p38 MAPK (Fig. 5a), phospho-p53 (Fig. 5b), p21 (Fig. 5c), and phospho-cdc2 (Fig. 5d) were observed by ICW after 24 hr of treatment with mixture 4. Results showed increased phosphorylation of P38 and P53 proteins and accumulation of P21 in a dose-response manner as well as a decrease in the phosphorylation of the cdc2 kinase. These responses were significant at 3 and 10 μ M for P-21 and at 30 μ M for P-P53 and P-cdc2 (Fig. 5). All these data support the hypothesis that mixture 4 was responsible for a genotoxic insult that resulted in a cell cycle arrest.

Combined Effects of Individual Compounds in Mixture 4

To identify the compound(s) responsible for the genotoxicity of mixture 4 (Fig. 2) and to detect a possible combined effect, the γ -H2AX assay was performed using each of the five compounds present in mixture 4 (cyprodinil, fludioxonil, λ -cyhalothrin, procymidone, iprodione) (Fig. 6A). Five concentrations (0.2, 0.6, 2, 6, and 20 μ M) were tested, corresponding to the concentration of each compound in the mixture 4 at equimolar concentrations (Figs. 2, 3, 4, and 5). Only fludioxonil and cyprodinil induced γ -H2AX at 6 and 20 μ M, respectively. At the same concentrations, the comet assay did not reveal any DNA damage (data not shown). A more detailed analysis of the genotoxicity of fludioxonil showed that this compound induced γ -H2AX from 4 μ M with more than 20% cytotoxicity on HepG2 cells from 10 μ M (Fig. 6b). No cytotoxicity of the other pesticides in mixture 4 was observed at the concentrations tested (data not shown). However, whereas the equimolar combination of the five compounds at 0.6 μ M in the mixture 4 (3 μ M of the mixture) had a genotoxic effect (Fig. 2), at the same concentration (0.6 μ M), each individual compound caused no DNA damage (Fig. 6A), suggesting a combined genotoxic effect of the mixture. Similar conclusions were drawn from the cytotoxicity data.

Effects of Mixture 4 Reflecting the Contamination Levels in the French Diet

The genotoxicity and the cytotoxicity of mixture 4 containing each pesticide at the actual concentration observed

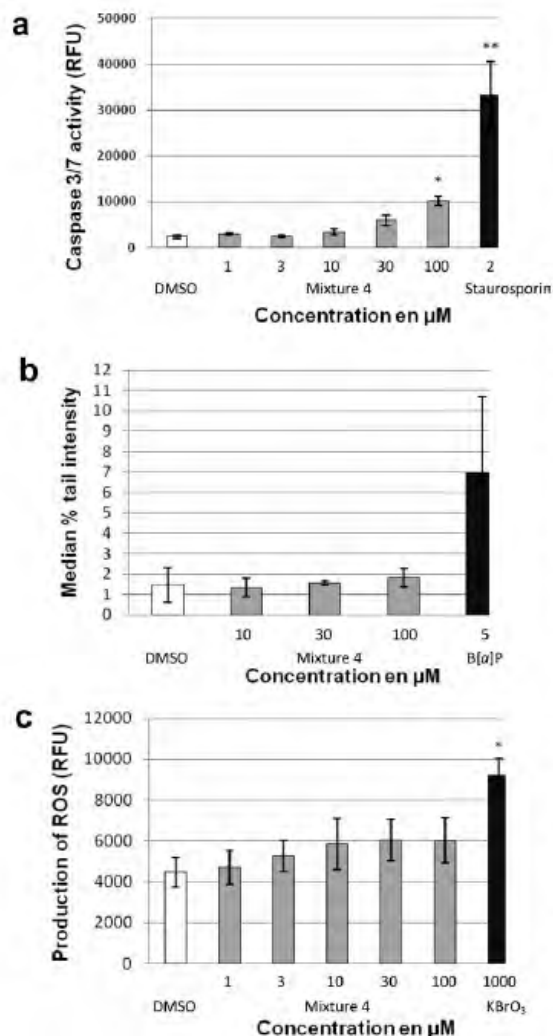


Fig. 4. DNA damage measured in the HepG2 cell line after treatment with mixture 4. Caspase 3/7 activity (a), comet assay (b) and ROS levels (c) were measured after 22 or 24 hr of treatment with pesticide mixture 4. The negative control was 0.2% DMSO and the positive control was B[a]P at 5 μ M for the comet assay, 2 μ M staurosporin for measurement of caspase activity and 1 mM KBrO_3 for ROS quantification. Each value represents the mean \pm SEM ($n = 3$). Symbol (*) indicates statistical significance compared with the solvent control, $p < 0.01$.

in the French diet (procymidone 42%, iprodione 33%, cyprodinil 16%, fludioxonil 9%, and λ -cyhalothrin 1%, (Crepet et al., 2011 submitted) were also tested. Five final concentrations of the mixture were tested (1, 3, 10, 30, and 100 μ M). Clear genotoxic and cytotoxic effects were observed but at higher concentrations (30 vs. 3 μ M) than in mixture 4 at equimolar concentration (Fig. 7). The lower genotoxic and cytotoxic effects of the mixture in the real proportion compared to the equimolar concentra-

tions could be partially explained by the fact that the proportion of the fludioxonil in the real proportion mixture was lower than in the equimolar mixture (9 vs. 20%).

DISCUSSION

The aim of this study was (i) to measure in vitro cytotoxic and genotoxic effects of pesticide mixtures at equimolar concentrations of each chemical and (ii) in the case of positive genotoxic results, to determine whether the pesticides in the mixture have combined effects both at equimolar concentrations and at concentrations representing the actual proportion of the pesticides to which French consumers are exposed. For this purpose, the cytotoxicity and the genotoxicity of seven pesticide mixtures present in food commodities collected in France during the 2006 survey of pesticide residues were analyzed. Four human cell lines originating from potential target tissues of these contaminants were used: liver (HepG2), kidney (ACHN), colon (LS-174T), and brain (SH-SY5Y). The ICW technique has the great advantage of allowing simultaneous determination of the genotoxicity and the cytotoxicity of xenobiotics [Audebert et al., 2010, 2011]. In addition, ICW was found to be more sensitive than the MTT cytotoxic assay (Table II).

The cytotoxic and the genotoxic potential of the pesticide mixtures were screened using the γ -H2AX assay. This assay reveals genotoxicity in the form of the different types of DNA damage it induces [Sedelnikova et al., 2010]. To avoid false positive genotoxic signals due to cell apoptosis or necrosis [Barnes et al., 2010], we considered that a compound (or a mixture) is genotoxic only if the viability measured by ICW was above 80%, as recommended by several authors in others in vitro genotoxic assays [Muller and Sofuni, 2000; Kirkland et al., 2007]. Moreover, we considered that a compound (or a mixture) is genotoxic if the induction of H2AX phosphorylation was statistically at least 20% higher than the control because limited increases (< 20%) in H2AX phosphorylation are difficult to interpret correctly. Only mixture 4 at equimolar concentration met all these criteria by inducing significant dose-dependent H2AX phosphorylation (from 3 μ M) when tested at subtoxic concentrations on HepG2 cells. To check if the H2AX phosphorylation observed was specifically due to DNA damage caused by mixture 4 and not the result of DNA fragmentation due to apoptosis, caspase 3/7 activity was measured. At low concentrations, neither cytotoxicity nor caspase activity was observed. These data confirmed that, together with the criteria used for this study (low cytotoxicity and 20% increase in γ -H2AX), true DNA damaging compounds or mixtures can be identified with this assay thus avoiding false positive γ -H2AX signals due to cell apoptosis or necrosis. The assays carried out in the three other cell lines gave

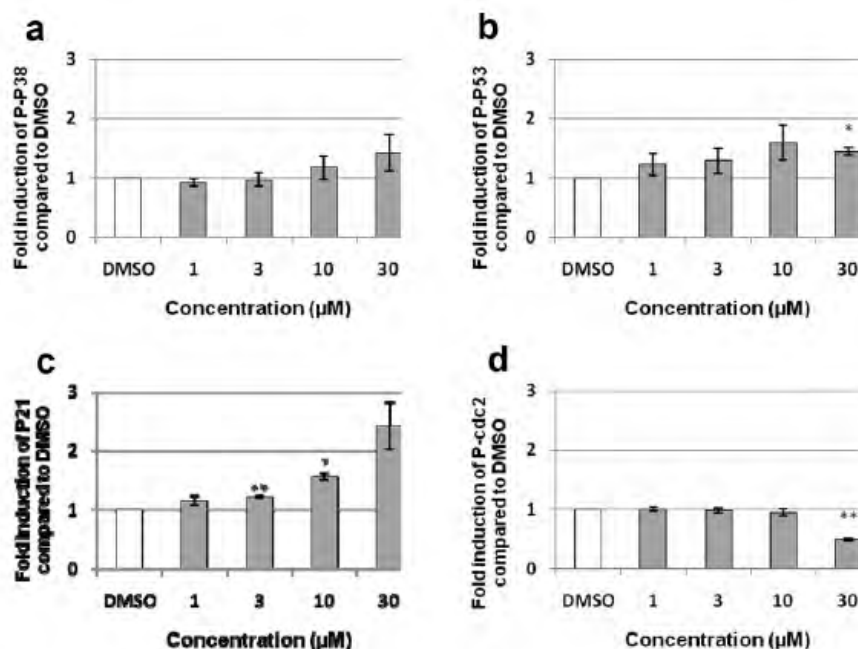


Fig. 5. ICW determination of proteins involved in the DNA damage signaling pathway. Phospho-p38 MAPK (a), phospho-p53 (b), p21 (c) and phospho-cdc2 (d) quantified in HepG2 cells after 24 hr of treatment with pesticide mixture 4 at concentrations of 1, 3, 10 and 30 μ M. Each value represents the mean \pm SEM ($n \geq 3$). Significant differences were observed between DMSO controls and matched groups (* $P = 0.05$, ** $P = 0.01$).

negative genotoxic results, demonstrating the interest of using different cell lines with distinctive sensitivity and properties for in vitro screening of xenobiotic effects [Huang et al., 2008; Xia et al., 2008]. Nonetheless, we cannot rule out the possibility that in some of our mixtures of pesticides an antagonist action could have occurred, possibly masking the genotoxicity of some individual pesticides.

Analysis of the global disturbance in cell signaling caused by mixture 4 revealed an increase in phosphorylated P38 and P53 proteins, an accumulation of P21 and a decrease in the phosphorylation of cdc2 kinase. These results agree with the results of the H2AX phosphorylation assay, as these responses correspond to cell cycle arrest due to a genotoxic insult [Wang and Prives, 1995; Levine, 1997; Stuart and Wang, 2009]. Moreover, the lower number of cells detected in HepG2 cells with 30 μ M of mixture 4 compared with the control vehicle may be due to cell cycle arrest, which stopped cell growth rather than causing cell death.

Pesticide mixture 4 contained four fungicides (procymidone, iprodione, cyprodinil, fludioxonil) and one insecticide (λ -cyhalothrin). Among these compounds, only procymidone has been excluded from the authorized list of pesticides (Annex I of the European directive 91/414,

2006). Iprodione, procymidone and λ -cyhalothrin have been shown to be capable of generating oxidative stress that could result in DNA damage [Lodovici et al., 1997; Radice et al., 1998; Radice et al., 2004; Zhang et al., 2010]. ROS production could be the cause of the DNA damage observed with mixture 4. However, mixture 4 gave negative results in both the ROS production and the comet assays (Fig. 4). The comet assay was also performed using fpg enzyme to increase the sensitivity of the assay to oxidative DNA damage, but again gave negative results for mixture 4 (data not shown). An 8 hr period was needed before the genotoxicity of mixture 4 was detected with the γ -H2AX assay, a marker known to be an early indicator of DNA damage. All these data suggest that at least some of the active compounds present in this mixture need to be metabolized by HepG2 cells prior to reacting with DNA, as is the case for B[a]P. Our study confirmed that the γ -H2AX assay is more sensitive than the comet assay for bulky DNA adduct detection [Audebert et al., 2010] as already demonstrated for other types of DNA damage [Ismail et al., 2007; Trouiller et al., 2009; Watters et al., 2009; Leopardi et al., 2010]. One possible explanation for its higher sensitivity may be the fact that with γ -H2AX assay, only one double strand break per nucleus can be detected instead of 5–10 double

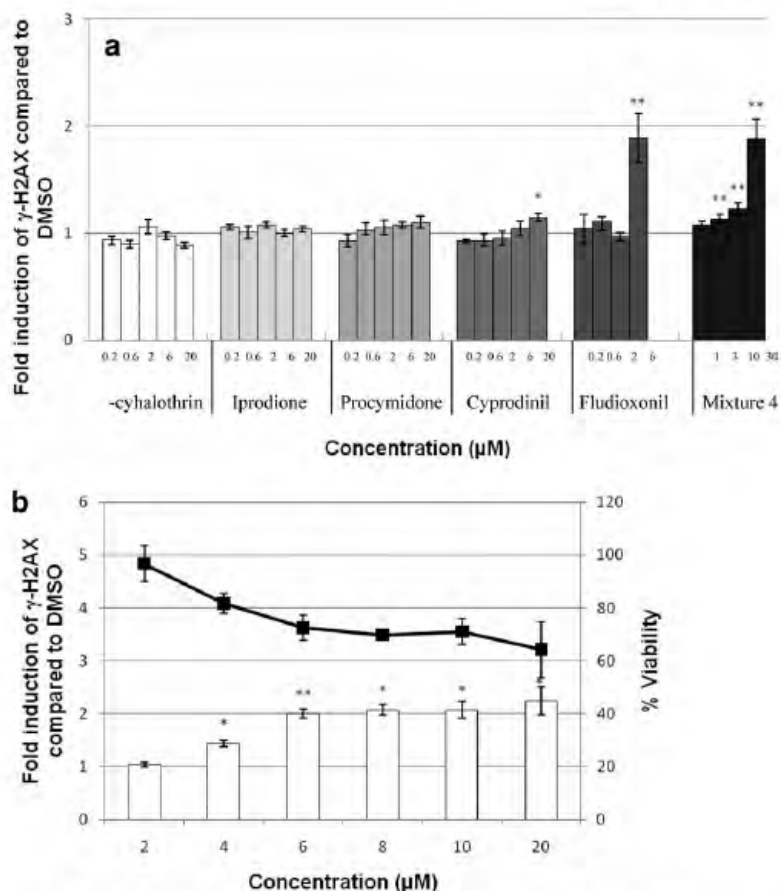


Fig. 6. ICW determination of γ -H2AX on the HepG2 cell line after 24 hr of treatment with pesticide mixture 4 and with the corresponding individual compounds. λ -Cyhalothrin, iprodione, procymidone, cyprodinil and fludioxonil were tested at concentrations corresponding to their

levels in the mixture (0.2, 0.6, 2, 6 and 20 μ M) (a). Cytotoxicity and γ -H2AX determination in the HepG2 cell line after 24 hr of treatment with fludioxonil (b). Significant differences were observed between DMSO controls and matched groups (* P = 0.05, ** P = 0.01).

strand breaks per nucleus with the comet assay. In addition, we analyzed more than 80,000 cells per experiment in the γ -H2AX assay compared with 200–500 cells with the comet assay.

When the pesticides in mixture 4 were investigated separately on HepG2 cells, only fludioxonil (from 4 μ M upwards) and to a lesser extent cyprodinil (20 μ M) gave positive results with γ -H2AX, suggesting that these compounds may be mainly responsible for the genotoxic effect of mixture 4. Several studies showed that procymidone, iprodione, cyprodinil, fludioxonil, and λ -cyhalothrin are not genotoxic in vitro [EFSA, 2007]. However, some controversial data exist regarding fludioxonil and cyprodinil. The Ames mutagenicity data reported by EFSA for these two fungicides gave negative results, whereas more recently, Isidori and coworkers [Isidori et al., 2009] reported that these compounds were shown to be poten-

tially mutagenic with both the Ames assay and the SOS chromotest. Moreover, in vitro chromosomal aberration was observed with fludioxonil on CHO cells as well as unscheduled DNA synthesis in primary rat hepatocytes [EFSA, 2007].

Among the four selected cell lines, only LS-174T and HepG2 are able to substantially metabolize xenobiotics, each according to different metabolic patterns [Iwanari et al., 2002; Audebert et al., 2011]. Our results indicate that the genotoxicity of fludioxonil could be due to the formation of reactive intermediates during its biotransformation. Limited data are available in the literature regarding fludioxonil metabolism, however, WHO reported the presence of hepatic unextractable radioactive residues in goats orally treated with 14 C-fludioxonil, supporting the hypothesis of metabolic bioactivation of this phenylpyrole fungicide [FAO/WHO, 2004] resulting in a bioactive compound

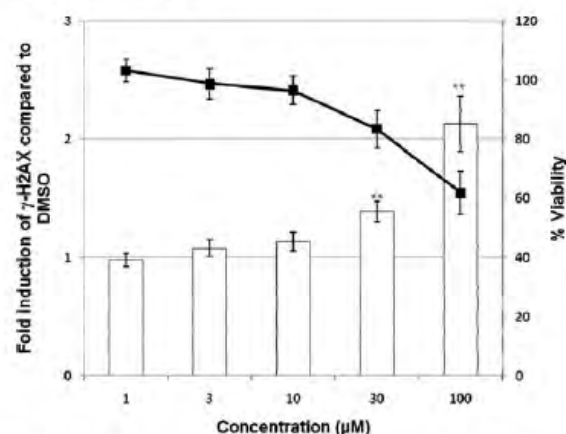


Fig. 7. ICW determination of γ -H2AX and cytotoxicity of pesticide mixture 4. Relative levels of each compound were in accordance with their occurrence in the French diet (procymidone: 42%, iprodione: 33%, cyprodinil: 16%, fludioxonil: 9%, and λ -cyhalothrin: 1%). Each value represents the mean \pm SEM ($n \geq 3$) after 24 hr of treatment on the HepG2 cell line. Significant differences were observed between DMSO controls and matched groups (* $P = 0.05$, ** $P = 0.01$).

able to form adducts to endogenous macromolecules like proteins or DNA. Similar results were observed in hens [FAO/WHO, 2004]. Moreover, fludioxonil induced increased incidence of hepatocellular tumors in rats [EFSA, 2007]. The metabolic pathways of fludioxonil indicate that the pyrrole ring is hydroxylated at positions C-2 or C-5, but also on the nitrogen atom, resulting in an N-hydroxylamine. Both C-hydroxylated and N-hydroxylated metabolites are further metabolized by phase II enzymes to form either glucuronide or sulfate conjugates [FAO/WHO, 2004]. N-hydroxylamine, but also corresponding sulfate conjugates, are known to be unstable and may result in genotoxic effects [Skipper et al., 2010], whereas glucuronide conjugates are stable and easily excreted. The higher glucuronidation rate observed in LS-174T compared with HepG2 cells [Audebert et al., 2011] could partly explain the contrasted response to the genotoxicity of fludioxonil by the two cell lines.

At the highest concentration of mixture 4 at equimolar concentration (30 μ M) tested, the cytotoxicity and the genotoxicity measured by the γ -H2AX assay in the HepG2 cells can be explained by the effect of fludioxonil concentration per se in the mixture (6 μ M). This finding is in accordance with the results obtained with mixture 4 used at concentrations reflecting consumer exposure, i.e., containing 16% cyprodinil and 9% fludioxonil instead of 25%. In this case, the significant genotoxic response observed at concentrations 10 fold higher than the equivalent equimolar mixture (30–100 μ M vs. 3–30 μ M) could be partly explained by the lower fludioxonil concentration (2.7-fold lower). However, when mixture 4 at equimolar concentration was tested at lower concentrations (3 and

10 μ M) resulting in positive genotoxic effects of the mixture, the levels of fludioxonil were = 2 μ M. At these concentrations, fludioxonil alone is not genotoxic. Our results cannot be explained simply by additive combination effects, and suggest that one or several pesticide(s) present in mixture 4 could potentiate the genotoxic action of fludioxonil and/or cyprodinil. This cocktail effect could be due to a modification in the metabolism of these compounds by the other pesticides present in the mixture. Although only a limited number of studies have dealt with the combined cytotoxic or genotoxic effect of pesticides, there have been reports indicating that active chemicals may act synergistically [Olgun et al., 2004; Das et al., 2007]. Additional assays would be necessary to identify which compounds play a role in the combined effect observed with mixture 4 and the mechanism involved in this interaction.

Based on a very recent study on in vitro-to-in vivo extrapolation models to estimate the daily human oral dose from in vitro data, we measured the relation between the concentrations of fludioxonil and cyprodinil tested in vitro and the internal dose in vivo [Wetmore et al., 2011]. When we considered the lowest concentration of fludioxonil (4 μ M) and cyprodinil (20 μ M) that was genotoxic for HepG2 cells, using the in vitro-to-in vivo extrapolation model cited above, we postulated that the concentrations of fludioxonil and cyprodinil represent an oral equivalent dose of 1.54 and 0.039 mg/kg/day respectively. Compared with human exposure data for fludioxonil (0.36 μ g/kg/day) and cyprodinil (0.32 μ g/kg/day), estimated in the French population [Crepet et al., submitted], we estimated that for fludioxonil the effective genotoxic dose in vitro is 4,000 fold higher than the theoretical internal dose for the general population. For cyprodinil, a similar calculation indicated that the effective genotoxic dose in vitro is 56 fold higher than the theoretical internal dose. Whether these pesticides are able to induce DNA damage and have a combined effect remains to be investigated in vivo.

ACKNOWLEDGMENTS

The SHSY-5Y cell line was a generous gift from Dr J-M Zajac (IPBS-CNRS-UMR 5089, Toulouse, France). The authors would like to thank Dr. M. Tremblay Franco for helpful discussions on the statistical approach applied to the data.

REFERENCES

- Audebert M, Dolo L, Perdu E, Cravedi JP, Zalko D. 2011. Use of the gammaH2AX assay for assessing the genotoxicity of bisphenol A and bisphenol F in human cell lines. *Arch Toxicol* 85: 1463–1473.

- Audebert M, Riu A, Jacques C, Hillenweck A, Jamin EL, Zalko D, Cravedi JP. 2010. Use of the gammaH2AX assay for assessing the genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in human cell lines. *Toxicol Lett* 199:182–192.
- Barnes L, Dumas M, Juan M, Noblesse E, Tesniere A, Schnebert S, Guillot B, Moles JP. 2010. GammaH2AX, an accurate marker that analyzes UV genotoxic effects on human keratinocytes and on human skin. *Photochem Photobiol* 86:933–941.
- Bartkova J, Horejsi Z, Koed K, Kramer A, Tort F, Zieger K, Guldborg P, Selsted M, Nesland JM, Lukas C, Ørntoft T, Lukas J, Bartek J. 2005. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* 434:864–870.
- Bolognesi C, Creus A, Ostrosky-Wegman P, Marcos R. 2011. Micronuclei and pesticide exposure. *Mutagenesis* 26:19–26.
- Crepet A, Tressou J. 2011. Bayesian nonparametric model for clustering individual co-exposure to pesticides found in the French diet. *Bayesian analysis* 6:127–144.
- Das PP, Shaik AP, Jamil K. 2007. Genotoxicity induced by pesticide mixtures: In-vitro studies on human peripheral blood lymphocytes. *Toxicol Ind Health* 23:449–458.
- EFSA. 2007. Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance fludioxonil. Available at: http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/praper_concl_sr110_fludioxonil_en.pdf?ssbinary=true.
- EFSA. 2008. Opinion of the scientific panel on plant protection products and their residues to evaluate the suitability of existing methodologies and, if appropriate, the identification of new approaches to assess cumulative and synergistic risks from pesticides to human health with a view to set MRLs for those pesticides in the frame of Regulation (EC) 396/2005. Available at: <http://www.adverteer.com/ftp/articles/A1060608.pdf>, 704:1–84.***
- EFSA. 2010. Annual Report on Pesticide Residues according to Article 32 of Regulation (EC) n° 396/2005. Available at: <http://www.efsa.europa.eu/fr/efsajournal/pub/1646.htm>.
- FAO/WHO. 2004. Pesticide residues in food 2004. Available at: http://www.fao.org/ag/AGP/AGPP/Pesticid/JMPR/Download/2004_eva/JMPR2004eva.pdf.
- Gorgoulis VG, Vassiliou LV, Karakaidos P, Zacharatos P, Kotsinas A, Liloglou T, Venere M, Dittullo RA, Jr., Kastriakis NG, Levy B, Kletsas D, Yoneta A, Herlyn M, Kittas C, Halazonetis TD. 2005. Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature* 434:907–913.
- Huang R, Southall N, Cho MH, Xia M, Ingles J, Austin CP. 2008. Characterization of diversity in toxicity mechanism using in vitro cytotoxicity assays in quantitative high throughput screening. *Chem Res Toxicol* 21:659–667.
- Isidori M, Caterino E, Crisculo E, Fatigati V, Liguori G, Parrella A. 2009. Antimutagenic and antigenotoxic effects of vegetable matrices on the activity of pesticides. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 26:1049–1062.
- Ismail IH, Wadhwa TI, Hammarsten O. 2007. An optimized method for detecting gamma-H2AX in blood cells reveals a significant inter-individual variation in the gamma-H2AX response among humans. *Nucleic Acids Res* 35:e36.
- Iwanari M, Nakajima M, Kizu R, Hayakawa K, Yokoi T. 2002. Induction of CYP1A1, CYP1A2, and CYP1B1 mRNAs by nitropolycyclic aromatic hydrocarbons in various human tissue-derived cells: Chemical-, cytochrome P450 isoform-, and cell-specific differences. *Arch Toxicol* 76:287–298.
- Khanna KK, Jackson SP. 2001. DNA double-strand breaks: Signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet* 27:247–254.
- Kirkland D, Pfueller S, Tweats D, Aardema M, Corvi R, Darroudi F, Elhajouji A, Glatt H, Hastwell P, Hayashi M, Kasper P, Kirchner S, Lynch A, Marzin D, Maurici D, Meunier JR, Müller L, Nohynek G, Parry J, Parry E, Thyband V, Tice R, van Benthem J, Vanparys P, White P. 2007. How to reduce false positive results when undertaking in vitro genotoxicity testing and thus avoid unnecessary follow-up animal tests: Report of an ECVAM Workshop. *Mutat Res* 628:31–55.
- Leopardi P, Cordelli E, Villani P, Cremona TP, Conti L, De Luca G, Crebelli R. 2010. Assessment of in vivo genotoxicity of the rodent carcinogen furan: Evaluation of DNA damage and induction of micronuclei in mouse splenocytes. *Mutagenesis* 25:57–62.
- Levine AJ. 1997. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88:323–331.
- LioRET S, Dubuisson C, Dufour A, Touvier M, Calamassi-Tran G, Maire B, Volatier JL, Lafay L. 2011. Trends in food intake in French children from 1999 to 2007: Results from the INCA (étude Individuelle Nationale des Consommations Alimentaires) dietary surveys. *Br J Nutr* 103:585–601.
- Lodovici M, Casalini C, Briani C, Dolara P. 1997. Oxidative liver DNA damage in rats treated with pesticide mixtures. *Toxicology* 117:55–60.
- Matsuzaki K, Harada A, Takeiri A, Tanaka K, Mishima M. 2010. Whole cell-ELISA to measure the gammaH2AX response of six aneugens and eight DNA-damaging chemicals. *Mutat Res* 700:71–79.
- Muller L, Sofuni T. 2000. Appropriate levels of cytotoxicity for genotoxicity tests using mammalian cells in vitro. *Environ Mol Mutagen* 35:202–205.
- Olgun S, Gogal RM, Jr., Adeshina F, Choudhury H, Misra HP. 2004. Pesticide mixtures potentiate the toxicity in murine thymocytes. *Toxicology* 196:181–195.
- Osseni RA, Debbasch C, Christen MO, Rat P, Warnet JM. 1999. Tacrine-induced reactive oxygen species in a human liver cell line: The role of anethole dithiolethione as a scavenger. *Toxicol In Vitro* 13:683–688.
- Radice S, Fumagalli R, Chiesara E, Ferraris M, Frigerio S, Marabini L. 2004. Estrogenic activity of procymidone in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes: A possible mechanism of action. *Chem Biol Interact* 147:185–193.
- Radice S, Marabini L, Gervasoni M, Ferraris M, Chiesara E. 1998. Adaptation to oxidative stress: Effects of vinclozolin and iprodione on the HepG2 cell line. *Toxicology* 129:183–191.
- Sedelnikova OA, Redon CE, Dickey JS, Nakamura AJ, Georgakilas AG, Bonner WM. 2010. Role of oxidatively induced DNA lesions in human pathogenesis. *Mutat Res* 704:152–159.
- Skipper PL, Kim MY, Sun HL, Wogan GN, Tannenbaum SR. 2010. Monocyclic aromatic amines as potential human carcinogens: Old is new again. *Carcinogenesis* 31:50–58.
- Stuart SA, Wang JY. 2009. Ionizing radiation induces ATM-independent degradation of p21Cip1 in transformed cells. *J Biol Chem* 284:15061–15070.
- Tanaka T, Halicka HD, Huang X, Traganos F, Darzynkiewicz Z. 2006. Constitutive histone H2AX phosphorylation and ATM activation, the reporters of DNA damage by endogenous oxidants. *Cell Cycle* 5:1940–1945.
- Trouiller B, Reliene R, Westbrook A, Solaimani P, Schiestl RH. 2009. Titanium dioxide nanoparticles induce DNA damage and genetic instability in vivo in mice. *Cancer Res* 69:8784–8789.
- Wang Y, Prives C. 1995. Increased and altered DNA binding of human p53 by S and G2/M but not G1 cyclin-dependent kinases. *Nature* 376:88–91.
- Watters GP, Smart DJ, Harvey JS, Austin CA. 2009. H2AX phosphorylation as a genotoxicity endpoint. *Mutat Res* 679:50–58.
- Weichenthal S, Moase C, Chan P. 2010. A review of pesticide exposure and cancer incidence in the Agricultural Health Study cohort. *Environ Health Perspect* 118:1117–1125.
- Wetmore BA, Wambaugh JF, Ferguson SS, Sochaski MA, Rotroff DM, Freeman K, Clewell HJ III, Dix DJ, Andersen ME, Houck KA, Allen B, Judson RS, Singh R, Kavlock RJ, Richard AM, Thomas RS. 2011. Integration of dosimetry, exposure and high-through-

12 Graillet et al.

- put screening data in chemical toxicity assessment. *Toxicol Sci*, doi: 10.1093/toxsci/kfr254.
- Xia M, Huang R, Witt KL, Southall N, Fostel J, Cho MH, Jadhav A, Smith CS, Inglese J, Portier CJ, Tice RR, Austin CP. 2008. Compound cytotoxicity profiling using quantitative high-throughput screening. *Environ Health Perspect* 116:284–291.
- Yoshikawa T, Kashino G, Ono K, Watanabe M. 2009. Phosphorylated H2AX foci in tumor cells have no correlation with their radiation sensitivities. *J Radiat Res (Tokyo)* 50:151–160.
- Zhang Q, Wang C, Sun L, Li L, Zhao M. 2010. Cytotoxicity of lambda-cyhalothrin on the macrophage cell line RAW 264.7. *J Environ Sci (China)* 22:428–432.
- Zhou C, Li Z, Diao H, Yu Y, Zhu W, Dai Y, Chen FF, Yang J. 2006. DNA damage evaluated by gammaH2AX foci formation by a selective group of chemical/physical stressors. *Mutat Res* 604:8–18.

Accepted by—
W. Baird

Discussion

Dans un premier temps, afin de montrer que la technique d'ICW était bien adaptée à la mesure de la cytotoxicité, une comparaison entre cette technique et le test MTT portant sur les 7 mélanges de pesticides a été effectuée sur la lignée HepG2. Les résultats ont montré que le test ICW était plus sensible que celui du MTT. Cette meilleure sensibilité a également été observée dans une précédente étude menée au laboratoire, qui comparait le test ICW avec celui de la quantification de l'ATP (Audebert et al. 2010). L'autre intérêt de tester la cytotoxicité de substances par ICW, réside dans le fait que cette mesure a lieu sur la même plaque que le test de génotoxicité γ -H2AX, ce qui évite les erreurs de manipulation et autorise le criblage à haut débit (Audebert et al. 2010). Pour éviter une surestimation de la génotoxicité, de nombreux auteurs recommandent de prendre en considération le phénomène génotoxique uniquement si la viabilité est supérieure à 80 % (Kirkland et al. 2007; Muller and Sofuni 2000). En effet, dans le cas du test des comètes, ou de γ -H2AX qui observent des cassures d'ADN, le résultat positif obtenu peut être dû à un processus d'apoptose et non de génotoxicité. C'est pourquoi il est recommandé de faire un test de viabilité en parallèle (Audebert et al. 2011; Barnes et al. 2010; EFSA 2011c).

Sur les 7 mélanges testés avec le test γ -H2AX, sur les quatre lignées cellulaires humaines, un seul, constitué de procymidone, iprodione, cyprodinil, fludioxonil et de λ -cyhalothrine est génotoxique. Ce premier criblage a permis de montrer, sur les cellules HepG2 uniquement, que seul le mélange 4 était génotoxique de façon dose-dépendante à partir de 3 μ M jusqu'à 30 μ M. Au-delà de 30 μ M, on observe une forte cytotoxicité du mélange (46 % de viabilité pour 100 μ M). Seulement deux lignées expriment fortement les enzymes du métabolisme de phase I et II : il s'agit des cellules LS-174T qui proviennent du côlon, et HepG2 qui proviennent d'un hépatocarcinome de foie. Une étude a montré que l'expression des CYP1A1, 1A2, 2B6, 3A4 et des SULT 1A1, 1A2, 1E1, 2A2 et 2A1 était conservée chez HepG2 à des niveaux proches de celui des hépatocytes primaires humains (Westerink and Schoonen 2007a; Westerink and Schoonen 2007b). Cette lignée cellulaire est donc un bon modèle d'étude pour effectuer un premier criblage. Le mélange 4 n'étant pas génotoxique sur les deux autres lignées cellulaires (SH-SY5Y et ACHN), qui n'expriment que très peu d'enzymes de biotransformation des xénobiotiques (Iwanari et al. 2002; Kress and Greenlee 1997; Mannerström et al. 2006; Spink et al. 1997; Valdiglesias et al. 2011b), il est permis d'émettre l'hypothèse qu'un ou plusieurs constituants du mélange soient génotoxiques uniquement après biotransformation. Une grande variabilité d'expression et de quantité d'enzymes de biotransformation est observée d'un organe à l'autre mais également d'une lignée cellulaire à l'autre (Iwanari et al. 2002). Dans notre étude, le mélange 4 n'est pas génotoxique sur la lignée cellulaire LS-174T. Une précédente étude

menée au laboratoire a montré que le bisphénol F (BPF), était génotoxique sur HepG2 mais pas sur LS-174T (Audebert et al. 2011). L'étude du métabolisme de ce composé sur ces deux lignées a montré une différence de profil métabolique et de taux de biotransformation entre ces cellules. Comparées aux cellules HepG2, les cellules LS-174T ont en effet plus de facilité à former des glucuronides. Inversement, les cellules HepG2 ont tendance à produire plus de conjugués sulfates. Cette différence d'activité enzymatique de phase II entre les deux lignées, peut expliquer pourquoi le mélange 4, comme le BPF, ne sont pas génotoxiques sur LS-174T.

Par la suite, l'étude du mélange 4 a été approfondie pour déterminer quel était le mécanisme de génotoxicité associé à ce mélange. Dans un premier temps, une cinétique a été réalisée pour déterminer à quel moment apparaissent les premières cassures double brin d'ADN détectables par le test γ H2AX. Celle-ci a confirmée qu'il fallait plus de 8 heures d'exposition, pour que les premiers dommages apparaissent. Le temps observé est alors semblable à celui de notre témoin positif, le B[a]P. Le B[a]P est un composé qui n'est génotoxique qu'après biotransformation ; les métabolites formés sont alors capables de produire des adduits à l'ADN (Audebert et al. 2010; Tarantini et al. 2011). Le temps nécessaire à l'apparition de l'effet génotoxique suggère, comme pour le B[a]P, que les pesticides du mélange 4 agissent de façon indirecte sur l'ADN et doivent être biotransformés en métabolites réactifs pour que le processus génotoxique soit enclenché.

L'analyse de l'activité des caspases 3/7 nous a également confirmé que l'induction d'H2AX phosphorylé aux concentrations non cytotoxiques pour la cellule, était bien due à de la génotoxicité et non à une fragmentation de l'ADN d'origine apoptotique. En revanche, à forte concentration (100 μ M) cette activité est observée, ce qui est en accord avec les résultats de la viabilité cellulaire trouvés par la technique d'ICW (46 % de viabilité), justifiant le seuil évoqué précédemment de 80 % de viabilité pour les mesures de génotoxicité.

Les tests réalisés sur les pesticides considérés individuellement, aux concentrations correspondant à leur teneur dans le mélange (de 0,2 à 20 μ M) (Tableau 6), ont montré que, sur les 5 produits testés individuellement sur HepG2, seuls le cyprodinil et le fludioxonil sont respectivement génotoxiques à 20 et 4 μ M. Il est également observé un effet du mélange aux faibles concentrations ; une induction de γ H2AX est détectée à 3 et 10 μ M pour le mélange, alors qu'à la concentration correspondante de chacune des substances (0,6 et 2 μ M), rien n'est observé. Cet effet ne peut être dû à de la potentialisation, puisqu'au moins deux composés du mélange sont génotoxiques. De plus, cet effet ne correspond pas à de l'additivité des réponses : dans l'exemple cité précédemment, l'effet génotoxique est observé à 10 μ M pour le mélange, alors que rien n'est observé pour le cyprodinil et le fludioxonil à 2 μ M (concentration équivalente) et de plus, aucun effet n'est observé pour les trois

autres composés quelle que soit la concentration testée. Par ailleurs, un effet additif uniquement entre le fludioxonil et le cyprodinil laisserait supposer un effet à 5 μM pour le fludioxonil et le cyprodinil. Or, si le premier est génotoxique à partir de 4 μM (Graillot et al. 2012), le second ne l'est qu'à partir de 20 μM . On peut dès lors supposer qu'il s'agit d'un phénomène de synergie, et que l'effet du cyprodinil associé à celui du fludioxonil augmenterait les dommages à l'ADN.

Ce mélange a été ensuite testé aux proportions retrouvées dans l'alimentation. Il a également été montré une induction de $\gamma\text{-H2AX}$, mais à des concentrations 10 fois plus élevée. En effet, la génotoxicité est observable à 30 μM pour les proportions reflétant l'exposition, alors qu'elle est de 3 μM pour les proportions équimolaires. Ceci s'explique par le fait que le fludioxonil qui est le composé le plus génotoxique des deux, est présent en moindre quantité par rapport au cyprodinil (respectivement 9 % et 16 % dans le mélange). À 30 μM , les concentrations en fludioxonil et cyprodinil sont donc respectivement d'environ 2,5 et 5 μM . Ces résultats confirment que l'effet ne peut être additif, puisque le fludioxonil et le cyprodinil ne sont pas génotoxiques à ces concentrations et soutiennent l'hypothèse de la synergie.

Le test $\gamma\text{-H2AX}$ permet de voir de nombreux dommages à l'ADN résultant de divers mécanisme de génotoxicité (formation d'adduits à l'ADN, cassures résultant d'action des ERO). Les cassures résultant d'action des ERO peuvent être soit directes et être observables à des temps court, soit indirectes après blocage des fourches de réplication. Le temps de doublement de la lignée cellulaire HepG2 est de 24h. La durée de traitement permet alors d'observer à la fois les cassures directes et indirectes des ERO. Un dosage des ERO a donc été réalisé pendant 24h de traitement et s'est avéré négatif pour le mélange équimolaire et pour le fludioxonil seul (composé le plus génotoxique des deux).

D'après les rapports de l'EFSA, le cyprodinil ainsi que le fludioxonil ne sont pas considérés comme génotoxiques (EFSA 2005a; EFSA 2007). Pourtant ce même rapport indique que le fludioxonil produit des aberrations chromosomiques sur des cellules CHO ainsi qu'une synthèse non programmée d'ADN sur des hépatocytes primaires de rat. De même, une étude *in vitro* utilisant les tests d'Ames et SOS chromotest a montré un potentiel mutagène de ces deux composés (Isidori et al. 2009). Un rapport de l'OMS indique qu'après administration orale de fludioxonil radiomarqué à des chèvres, de la radioactivité est retrouvée dans le foie sous forme de résidus liés, ce qui conforte l'hypothèse d'une bioactivation métabolique de ce composé (FAO/WHO 2004).

Chapitre V : Identification d'une famille de pesticides génotoxiques : les methyl- pyrazoles

Le but de cette étude est de déterminer le potentiel génotoxique de 14 substances actives retrouvées dans les denrées alimentaires en utilisant le test γ -H2AX. Le choix des pesticides à tester sur les lignées cellulaires s'est porté sur la première liste de pesticides identifiée à partir de la première hypothèse du calcul de la co-exposition (31 pesticides). Le nombre étant important, une deuxième sélection a ensuite été réalisée en se basant uniquement sur les pesticides communs entre les différents clusters d'individu (21 pesticides), puis en sélectionnant uniquement ceux qui étaient encore autorisés et ceux qui, bien qu'interdits, sont persistants dans l'environnement ou qui bénéficiaient d'une autorisation pour écouler les stocks. Au final une liste de 14 substances a été déterminée avec l'hypothèse du tirage aléatoire (Tableau 7). Les principales familles de pesticides sont représentées (acaricide, fongicide, herbicide, insecticide).

Le potentiel génotoxique des 14 pesticides a ensuite été testé sur les 4 lignées cellulaires humaines représentatives des cibles des contaminants alimentaires (HepG2, LS-174T, ACHN et SH-SY5Y).

Substance active	Statut (Annexe I de la directive 91/414/CE)	Fonction	Famille chimique	Classification cancérogènes/ mutagènes selon l'Union Européenne
Benalaxyl	Inscrit	Fongicide	Xylylalanine	
Esfenvalerate	Inscrit	Insecticide	Pyréthroïde	
Propyzamide	Inscrit	Herbicide	Amide	Carc.2
Lindane	Retiré, pesticide rémanent	Insecticide	Organochloré	
Pirimicarbe	Inscrit	Insecticide	Carbamate	
Pyriproxyfen	Inscrit	Insecticide	Non classé	
Acrinathrin	Retiré (autorisé jusqu'au 12/2011)	Insecticide	Pyréthroïde	
Tébufenpyrad	Inscrit (2009)	Insecticide	Pyrazole	
Bupirimate	Retiré (autorisé jusqu'au 12/2011)	Fongicide	Pyrimidine	
Myclobutanil	Retiré (autorisé jusqu'au 12/2011)	Fongicide	Azole	
Penconazole	Inscrit	Fongicide	Azole	
Chlordane	Banni, pesticide rémanent	Insecticide	Cyclodiène, organochloré	Carc.2
Dieldrin	Banni, pesticide rémanent	Insecticide	Cyclodiène, organochloré	Carc.2
Heptachlore	Banni, pesticide rémanent	Insecticide	Cyclodiène, organochloré	Carc.2

Tableau 7 : Liste des 14 pesticides obtenus à partir de l'hypothèse du tirage aléatoire des données de contamination censurées.

Article 3

Evidence of the *in vitro* genotoxicity of methyl-pyrazole pesticides on human cells.

Short title: Genotoxicity of methyl-pyrazole pesticides.

Vanessa Graillot^{1,2}

Jean-Pierre Cravedi^{1,2}

Marc Audebert^{1,2*}

Address: ¹ INRA, UMR1331, Toxalim, Research Centre in Food Toxicology, F-31027 Toulouse, France

² Université de Toulouse, INP, ENVT, EIP, UPS, UMR1331, Toxalim, F-31076 Toulouse, France

Corresponding author:

Marc AUDEBERT, Ph D

INRA-UMR1331, Toxalim, 180 chemin de Tournefeuille BP 93173

31027 Toulouse Cedex 3, France, Phone +33 561 285 008 Fax +33 561 285 244

E-mail address: marc.audebert@toulouse.inra.fr

Abstract

Daily, consumers are exposed to several pesticide residues present in food which can be of potential human health concern. Based on a previous study dealing with the exposure of the French population to pesticide residues *via* food, we selected 14 pesticides frequently found in the foodstuffs, due to their persistence in the environment or their bioaccumulation in the food chain. In a first step, the objective of this study was to investigate if the selected 14 pesticides presented cytotoxic and genotoxic potentials. For this purpose, we used a new sensitive genotoxic assay (γ H2AX) on four human cell lines (ACHN, SH-SY5Y, LS-174T and HepG2) originating from potential target tissues of food contaminants (kidney, nerve, colon and liver, respectively). Tebufenpyrad was the only one compound identified as genotoxic and the effect was only observed on SH-SY5Y neuroblastoma cell line. The time-course study showed that DNA damages appeared early after treatment (30 min), suggesting that an oxidative stress could be responsible of the γ H2AX induction. In a second step, three other pesticides (bixafen, fenpyroximate and tolfenpyrad) also having a methyl-pyrazole structure, as tebufenpyrad, were studied. All these compounds demonstrated a genotoxic potential on SH-SY5Y cells at low concentration (nanomolar range). Moreover, complementary experiments demonstrated that the same compounds exert also genotoxicity on a human T-cell leukemia cell line (Jurkat). These results demonstrated that tebufenpyrad, bixafen, fenpyroximat and tolfenpyrad induce DNA damage on human cell lines and require additional data before a conclusion can be drawn regarding hazard prediction to humans.

Keywords: pyrazole, pesticides, genotoxicity, γ -H2AX, human cell lines, SH-SY5Y cells.

1. Introduction

The widespread use of pesticides to control agricultural pests may lead to the presence of residues in the food chain and consumers can be exposed daily to low levels of these chemicals. Recently, the European Food Safety Authority (EFSA) reported that pesticide residues were detected in 46.7% of the 67 887 food samples analysed throughout the European Union in 2008 [1]. Several epidemiological studies published during the last two decades suggest harmful effects of pesticides on human health, including a possible relationship between pesticide use and cancers such as non-Hodgkin's lymphoma, leukemia, and various types of solid tumors. Many of these effects have been related to occupational exposures [2,3]; nevertheless, whether similar associations exist in the general population with lifetime exposure to very low doses of pesticides is not known.

DNA double strand-breaks (DSB) are considered as the most deleterious DNA damage to the cells, and may result in a carcinogenic process if the damage is not properly repaired [4]. After a DNA DSB, a cell signaling pathway is set in motion, resulting in the phosphorylation of histone H2AX, called γ H2AX. It was established that oxidative stress can lead to the phosphorylation of the histone H2AX [5]. This early and sensitive marker originates from various types of DNA damage (DNA adduct, DNA single-strand break, DNA replication or transcription blocking lesions) [6]. It was also reported that micronucleus formation is correlated with H2AX phosphorylation [7] and that γ H2AX is a reliable biomarker of pre-cancerous cells *in vivo* [8,9]. All these data support the assumption that H2AX phosphorylation could be an appropriate biomarker of genotoxicity as suggested by recent *in vitro* and *in vivo* studies [10-17].

In a previous study, a statistical method was developed in order to define pesticides which are present in the French diet in 2006 and so relevant to be studied in terms of human health effects [18]. Briefly, this method was based on the exposure to different pesticides

determined using data from the French national food monitoring administration, and data on the dietary habits from French consumption survey [19,20]. After modelization, two sub-population which were highly exposed to 34 compounds, was identified [18]. In our study, we retained three criteria to determine which pesticides will be analyzed for toxic potential among the 34 pesticides. Pesticides in common with the 2 clusters of population highly exposed (21 pesticides) were first retained in the list. Then, among the 21 pesticides, we retained at least 14 compounds : ten pesticides which were registered in the Annex I of the European directive 91/414 in 2008 (benalaxyl, esfenvalerate, penconazole, pirimicarb, propyzamide, pyriproxyfen, tebufenpyrad) or use still authorized in 2008 (acrinathrin, bupirimate, myclobutanil), and four pesticides considered permanent in the environment [21] (dieldrin, chlordane, lindane, heptachlore) (Table 1).

The aim of this study was to screen the cytotoxicity and genotoxicity of the 14 selected pesticides with the γ H2AX In Cell Western (ICW) assay [10,11]. The advantage of the ICW methodology is the simultaneous determination of cytotoxicity and genotoxicity of xenobiotics on cells in a 96-well plate format [10,11]. Four human cell lines (ACHN, SH-SY5Y, LS-174T and HepG2), originating from potential target tissues of food contaminants (kidney, nerve, colon and liver, respectively) were used. In a second step, due to the fact that tebufenpyrad was found positive in our assay, other methyl-pyrazole pesticides, namely bixafen, fenpyroximate and tolfenpyrad, were added to the list of investigated compounds.

2. Materiel and methods

2.1. Chemicals and cell culture media supplements

Tolfenpyrad (purity 99%) was obtained from CIL (Cluzeau Info Labo, Ste-Foy-la-Grande, France) and diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Falavier, France). All other pesticides (purity > 98%), as well as benzo[*a*]pyrene (B[*a*]P), camptothecin and etoposide were purchased from Sigma-Aldrich and diluted also in DMSO. Penicillin, Streptomycin, trypsin, PBS, RNase A (from bovine pancreas), and Triton X-100 were also purchased from Sigma-Aldrich. The phosphatase inhibitor cocktail tablets (“PHOSSTOP”) were purchased from Roche and the blocking solution (MAXblock Blocking Medium) was from Active Motif (Belgium). TO-PRO-3 iodide (diluted in 1/500 in PST) was purchased from Molecular Probes (Eugene, Oregon, USA).

2.2. Antibodies

Primary antibodies: Monoclonal anti-phospho-H2AX from rabbit was purchased from Cell Signalling Technology (Danvers, MA, USA) and diluted in 1/200 in PBS containing 2% fetal bovine serum (FBS) and 0.2% Triton X-100.

Secondary antibodies: goat anti-rabbit antibody coupled with 770 nm fluorophore (diluted 1/1000 in PST buffer) were purchased from Biotium (CA, USA).

2.3. Cells lines and maintenance

SH-SY5Y human neuroblastoma cells were maintained in DMEM/F12 medium, with 10 % FBS, 100 U ml⁻¹ penicillin and 100 µg ml⁻¹ streptomycin. ACHN human renal

adenocarcinoma cells (ATCC N° CRL-1611), HepG2 human hepatoblastoma cells (ATCC N° HB-8065), and LS-174T human epithelial colorectal adenocarcinoma cells (ATCC N° CL-188) were grown in α MEM medium, supplemented with 10% FBS and antibiotics (100 U ml⁻¹ penicillin and 100 μ g ml⁻¹ streptomycin). Jurkat T lymphocytes cells (ATCC N° TIB-152) were grown in RPMI medium, supplemented with 10% FBS and antibiotics. All cell lines grown in a humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37°C.

2.4. Pesticide treatment

For the HepG2, ACHN, LS-174T and SH-SY5Y cell lines, 2.6x10⁴, 4x10⁴, 3.2x10⁴ and 4x10⁴ cells per well, respectively, were grown in 96-well plates containing 200 μ L medium per well for 24 h. Then, the medium was replaced by pesticide concentrations diluted in medium without serum and cells were exposed to 0.2% (v/v) DMSO in culture medium.

For the screening of the genotoxicity of the 14 compounds, cells were incubated for 24 h with 4 concentrations of pesticides according the solubility or viability in duplicate. For the kinetics, SH-SY5Y cells were exposed from 30 min to 24 h to tebufenpyrad with three concentrations (0.1, 1, 10 μ M). Then, cytotoxic and genotoxic potentials of bixafen, fenpyroximate and tolfenpyrad, were studied after 24 h of treatment with 5 concentrations according to their solubility.

For Jurkat cell line, 3.6x10⁴ cells per well, were plated in 96-well plates with RPMI without FBS and treated the same day with three concentrations of bixafen, fenpyroximate, tebufenpyrad and tolfenpyrad. Then, cytotoxic and genotoxic potentials were determined after 24 h of treatment.

2.5. In Cell Western (ICW)

The In Cell Western technique was previously reported to allow the determination of cell viability concomitantly to genotoxicity for adherent cells (ACHN, HepG2, LS-174T and SH-SY5Y) [10,11]. Briefly, after treatment with pesticides, cells were fixed with paraformaldehyde (Electron Microscopy Science) at 4 % for 20 min for adherent cells. Then, cells were permeabilized with 0.2% Triton X-100 in PBS for 5 min and blocked with MAXblock Blocking Medium with PHOSSTOP and RNase A (0.1 g liter^{-1}) for 60 min at room temperature. Cells were incubated for 2 h with the primary antibody in PST buffer and after three 5 min washes in PST, a secondary detection was carried out with secondary antibody in mix with TO-PRO-3 iodide for DNA labeling. After 1 hour of incubation and three 5 min washes in PST, the DNA and the γ -H2AX were simultaneously visualized using an Odyssey Infrared Imaging Scanner (Li-Cor ScienceTec, Les Ulis, France) with the 680 nm and the 800 nm fluorophore. Relative fluorescent units for γ -H2AX per cell were divided by the fluorescence per cell for the vehicle controls to determine the modification in H2AX phosphorylation compared with the control. For cytotoxicity determination, DNA content in each experience was compared to DNA content in vehicle controls treated cells. All experiments were carried out in triplicate independently. The positive controls used in each treatment were $1 \text{ }\mu\text{M}$ benzo[*a*]pyrene for LS-174T and HepG2 cell lines, $1 \text{ }\mu\text{M}$ camptothecin for Jurkat cells and $1 \text{ }\mu\text{M}$ etoposide for ACHN and SH-SY5Y cell lines.

For Jurkat cells, after 24 h of treatment with pesticides, cells were fixed with $50 \text{ }\mu\text{L}$ paraformaldehyde at 20 % for 15 min. Then, cells were centrifuged for 10 min at 1500 rpm at room temperature. The paraformaldehyde was removed and neutralized with 20 mM NH_4Cl for 2 min. Then, cells were permeabilized three times with 0.1% Triton X-100 in PBS and centrifuged for 5 min at 1500 rpm, after blocking the non-specific sites with MAXblock Blocking Medium with PHOSSTOP and RNase A (0.1 g liter^{-1}) for 60 min. From this step, the protocol of ICW was the same as the one described for adherent cells.

2.6. Data analysis

Statistical analyses were performed using Student's *t*-test (one-tailed test). Statistical analysis was performed using the R Software. Error bars represent SEM (standard error of the mean). Statistically significant increase in H2AX phosphorylation compared with DMSO control; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

3. Results

3.1. Cytotoxicity and genotoxicity of the 14 selected pesticides.

In a first step, the cytotoxicity of the 14 selected pesticides was investigated on four human cell lines (HepG2, LS-174T, ACHN and SH-SY5Y) corresponding to potential target tissues of food contaminants. Due to the limited solubility of acrinathrin, benalaxyl, chlordane, dieldrin, esfenvalerate, lindane, heptachlor and tebufenpyrad in the culture media at 100 μ M, the cytotoxicity of these compounds was not determined at this concentration. Results showed that only pirimicarb and propyzamide were non-cytotoxic irrespective of the concentrations tested on the four human cell lines (Table 2). A cytotoxic effect was observed in at least one cell line for the other 12 compounds tested. At high concentrations, some pesticides (bupirimate, myclobutanil, penconazole, and chlordane) were more cytotoxic on LS-174T and SH-SY5Y cells than on HepG2 and ACHN cells (Table 2).

The genotoxicity of the 14 selected pesticides on the four cell lines using a genotoxic assay based on histone H2AX phosphorylation is shown on Fig. 1, 2, 3, 4. Genotoxicity was considered as effective if the compound tested resulted in a viability \geq 80% and if the induction of H2AX phosphorylation was statistically at least 20% higher than the control DMSO. No induction of genotoxicity was observed with the 14 selected pesticides on ACHN (Fig. 1), HepG2 (Fig. 2) or LS-174T cells (Fig.3). On SH-SY5Y cell line (Fig. 4), only tebufenpyrad was found to be genotoxic in a dose-dependent manner, from 1 μ M to 10 μ M (Fig. 4). Because γ H2AX is an early marker of DNA damage, the time course of the genotoxic effect of tebufenpyrad was investigated in these cells (from 30 min to 24 h). DNA damage was observed by γ H2AX induction 30 min after the exposure to tebufenpyrad (Fig 5). Then, after 1 h of treatment, the number of DNA DSB could not be detected, but after 2 h the γ H2AX induction increase continuously until the end of the experiment (24 h).

3.2. Cytotoxicity and genotoxicity potential of other methyl-pyrazole pesticides.

In order to elucidate whether the methyl-pyrazole structure was involved in the genotoxicity of tebufenpyrad (Fig 6A), three pesticides belonging to the same structural group were investigated, namely bixafen (Fig 6B), fenpyroximate (Fig. 6C) and tolfenpyrad (Fig 6D). Cytotoxicity was analyzed by the ICW assay. Among the four methyl-pyrazole pesticides tested, only bixafen was soluble at 100 μM . Fenpyroximate and tebufenpyrad were insoluble at this concentration. The highest tested concentration for tolfenpyrad, fenpyroximate was 3 and 10 μM , respectively. Results regarding cytotoxicity showed that for fenpyroximate and tebufenpyrad, the viability of SH-SY5Y cells at 24 h was significantly below 80% for concentrations ≥ 3 μM , whereas for bixafen the 80 % viability threshold was attained for values ≥ 30 μM (Fig 7A, 7B, 7C). In comparison with tebufenpyrad, no trace of cytotoxicity was observed with SH-SY5Y cells within the range of concentrations tested (0.1 to 10 μM , Table 2). As observed with tebufenpyrad, other methyl-pyrazole pesticides (bixafen, fenpyroximate and tolfenpyrad) were found to be genotoxic in a dose-dependent manner on this cell line. Genotoxicity was observed from 3, 1 and 0.01 μM for bixafen, fenpyroximate and tolfenpyrad, respectively (Figure 7A, 7B and 7C).

3.3. Genotoxicity potential of pyrazole pesticide on human lymphocyte cells.

As tebufenpyrad was demonstrated to be genotoxic on human lymphocytes [22], the genotoxicity of the four methyl-pyrazoles pesticides was tested on Jurkat cell line (human lymphocyte T cells) (Fig. 8). The four methyl-pyrazole pesticides exhibited similar genotoxic effects on the Jurkat cells, as previously found with SH-SY5Y cells. The lowest effect was observed with bixafen (starting at 10 μM), fenpyroximate was genotoxic at 3 μM , whereas

tolfenpyrad and tebufenpyrad were the most genotoxic tested compounds with a significant induction of DNA damage starting at 1 μ M (Fig. 8).

4. Discussion

The first objective of this study was to analyse the cytotoxic and genotoxic potentials of 14 pesticides chosen among 34 pesticides which are known to be present in the French diet (based on French occurrence data in food recently reported, [18]). To reach this goal, we used an approach newly developed in our team, allowing with the same assay the assessment of the cytotoxicity and the genotoxicity of chemicals [10,11,23]. Because *in vitro* cell models only express part of the metabolic capabilities expressed in the tissue they originate from, and have a different sensitivity to toxic compounds, xenobiotic effects were tested on various human cell lines [24,25]. Four human cell lines, derived from target organs of food contaminants, were chosen. The cytotoxic potential of the 14 selected pesticides was determined using the ICW technique. Only pirimicarb and propyzamide were non-cytotoxic on all cell lines tested (concentration range from 0.1 to 100 μ M). In terms of cytotoxicity, SH-SY5Y and LS-174T were the most sensitive cell lines, confirming previously observed results [23].

Considering that only values corresponding to a viability \geq 80 % were taken into account for estimating the genotoxic potential of the 14 compounds tested, we found that only tebufenpyrad was genotoxic in a dose-dependent manner on SH-SY5Y cell line. The negative results obtained for most of the tested compounds was expected since pesticides exhibiting genotoxic properties are currently banned for agricultural use within EU. Although limited to SH-SY5Y cells, the question of the significance of the positive outcome obtained with tebufenpyrad at 1 μ M level deserves to be raised.

In order to verify if the genotoxicity of tebufenpyrad was specific to this compound or could be attributed to the methyl-pyrazole structure, three other pesticides (bixafen, fenpyroximate and tolfenpyrad) having this chemical structure were assayed. As observed for tebufenpyrad, the three others methyl-pyrazole pesticides were genotoxic on SH-SY5Y cells. Bixafen and tebufenpyrad exhibited similar genotoxic potentials, whereas fenpyroximate and tolfenpyrad were genotoxic at concentrations 10 and 100 fold lower than observed for tebufenpyrad, respectively. These results suggest that the methyl-pyrazole structure of these compounds is involved in their genotoxic effect.

To the best of our knowledge, current published information on the genotoxic potential of methyl-pyrazole pesticides is very limited. No genotoxic effect of tebufenpyrad was observed with different *in vitro* regulatory genotoxic assays, including Ames test with bacteria, gene mutation test with Chinese hamster V79 cells, unscheduled DNA synthesis in rat primary hepatocytes, and *in vivo* mouse bone marrow erythrocyte test [22,26,27]. Nonetheless, cytogenetic experiments realized *in vitro* on human lymphocytes demonstrated that exposure to tebufenpyrad induced chromatid breaks in the absence of metabolic activation [22,26]. The Food Safety Commission in Japan reports that tolfenpyrad was not genotoxic for bacteria and no micronuclei in treated mice was observed, but as described with tebufenpyrad, chromosomal aberrations were induced in cultured Chinese hamster lung fibroblast V79 cells [28]. The genotoxicity of fenpyroximate was tested with regulatory genotoxic assay and no genotoxic or clastogenic potential was observed [29,30]. No published data was identified with respect to bixafen genotoxicity. Because US-EPA and CLH reported that tebufenpyrad was genotoxic on human lymphocytes, showing positive results without S9 liver fraction and equivocal results in the presence of S9 mix [22,26], the genotoxicity of the four methyl-pyrazole pesticides was tested on human lymphocyte T cells (Jurkat cell line). We clearly demonstrated that the four methyl-pyrazole pesticides (tebufenpyrad, bixafen, fenpyroximate

and tolfenpyrad) were genotoxic on the Jurkat cells with the same genotoxic potential as observed on the SH-SY5Y cells. A similar sensitivity to toxic xenobiotics of these two cell lines was also demonstrated with different types of compounds in two other studies [24,25]. These results confirm the usefulness of screening the toxic effect of compounds on different human cell lines.

The H2AX phosphorylation is an early and sensitive biomarker resulting from various types of DNA damages [6]. Previously, we demonstrated that DNA damage from DNA adducts generated by reactive metabolites in cells could be observed from 8 hours of treatment [10,23]. However, after only 30 min of treatment with tebufenpyrad on SH-SY5Y cells, first DNA damage can already be observed. This observation suggests that tebufenpyrad could induce DNA damage without a biotransformation process.

Mitochondria are a major source of reactive oxygen species in the cell [31,32]. An excessive electron flux or shunting through the mitochondrial respiratory chain conduct to an increase of ROS production and an inhibition of ATP synthesis. Complex I and complex III of the electron transport chain are the major sites of oxygen free radicals production [33,34]. ROS could interact with biomolecules and can induced disturbance of the cell by damaging different cell components, in particular DNA, proteins, and lipids. Many xenobiotics, including pesticides, can induce ROS production [35-37].

Tebufenpyrad is an inhibitor of the complex I of mitochondrial electron transport in insects and mites [22], but it was suggested that this compound is also able to inhibit the complex I of human mitochondria. Sherer and collaborators have demonstrated that mitochondrial electron transport inhibitors pesticides, notably tebufenpyrad and fenpyroximate, could deplete ATP in human neuroblastoma cells. Moreover, they observed an oxidative damage with two pesticides (rotenone and pyridaben) [33]. Several others studies observed the same response

with mitochondrial electron transport inhibitors [32,38,39]. Fenpyroximate and tolfenpyrad have the same mechanism of action that tebufenpyrad (inhibition the complex I of mitochondria in insects), whereas bixafen inhibit the complex II of mitochondria. The report from the Japanese Food Safety Commission indicates that tolfenpyrad can inhibit the respiration mitochondria complex I *in vivo* and *in vitro* [28]. Like with tebufenpyrad, it was shown that fenpyroximate could deplete ATP in neuroblastoma cells [33]. No data are accessible about bixafen capacity to inhibit human mitochondrial electron transport chain but bixafen inhibit the complex II of the mitochondria and it can be assumed that this effect could conduct to oxidative damage [40]. As for fenpyroximate, tebufenpyrad and tolfenpyrad, the genotoxic mechanism observed for bixafen in our study may be linked to the inhibition of the mitochondrial respiratory system resulting in ROS production and subsequent oxidative DNA damage.

In our study, tebufenpyrad did not induce DNA damage on ACHN, LS-174T or HepG2 cell lines. It can be speculated that negative results obtained with ACHN cells could be explained either by an efficient DNA repair pathways or by a lower sensitivity to ROS due to higher ROS detoxification rates in this cell line as compared to SH-SY5Y or Jurkat cells. Negative results obtained with HepG2 and LS-174T cells could be explained by their biotransformation capabilities, mainly resulting in the production of inactive metabolites [10,41], unable to inhibit the complex I of mitochondria electron chain and to induce ROS production.

5. Conclusion

The above data confirm that H2AX assay may be more sensitive than genotoxic test currently used [7,42-44]. Moreover, we confirm that this assay is well-adapted to screen genotoxicity of compounds on different human cell lines and potentially it could be used for

high-throughput screening purposes [24,25]. Although this study corroborates the fact that the pesticides to which consumers are exposed *via* food give no evidence of genotoxic response in most of the cell assays, it also shows that for tebufenpyrad, as well as for three other methyl-pyrazole pesticides, genotoxic effects were demonstrated in two human cell lines. Oxidative stress could play a role in this effect; however the mechanism of action by which methyl-pyrazole pesticides may damage DNA, as well as the reasons why this effect was observed specifically on SH-SY5Y and Jurkat cells remains to be investigated. In any case, more data are required before a general recommendation can be made regarding the potential hazard of tebufenpyrad, bixafen, fenpyroximate and tolfenpyrad to humans.

Acknowledgments

The authors would like to thank F. Tomasetig for technical assistance. This research was funded by the ANSES PNREST program (PESTIMPACT Contract N° EST-010/2/085) and the French “*Agence Nationale pour la Recherche*” (ANR PERICLES N° 2008-CESA 01601).

Conflict of interest statement

The authors are not aware of any conflicts of interest.

References

- [1] EFSA Annual Report on Pesticide Residues according to Article 32 of Regulation (EC) n° 396/2005., (2010).
- [2] M. Merhi, H. Raynal, E. Cahuzac, F. Vinson, J.P. Cravedi and L. Gamet-Payraastre Occupational exposure to pesticides and risk of hematopoietic cancers: meta-analysis of case-control studies, *Cancer Causes Control* 18 (2007) 1209-1226.
- [3] S. Weichenthal, C. Moase and P. Chan A review of pesticide exposure and cancer incidence in the Agricultural Health Study cohort, *Environ Health Perspect* 118 (2010) 1117-1125.
- [4] K.K. Khanna and S.P. Jackson DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection, *Nat Genet* 27 (2001) 247-254.
- [5] T. Tanaka, H.D. Halicka, X. Huang, F. Traganos and Z. Darzynkiewicz Constitutive histone H2AX phosphorylation and ATM activation, the reporters of DNA damage by endogenous oxidants, *Cell Cycle* 5 (2006) 1940-1945.
- [6] O.A. Sedelnikova, C.E. Redon, J.S. Dickey, A.J. Nakamura, A.G. Georgakilas and W.M. Bonner Role of oxidatively induced DNA lesions in human pathogenesis, *Mutat Res* 704 (2011) 152-159.
- [7] T. Yoshikawa, G. Kashino, K. Ono and M. Watanabe Phosphorylated H2AX foci in tumor cells have no correlation with their radiation sensitivities, *J Radiat Res (Tokyo)* 50 (2009) 151-160.
- [8] J. Bartkova, Z. Horejsi, K. Koed, A. Kramer, F. Tort, K. Zieger, P. Guldberg, M. Sehested, J.M. Nesland, C. Lukas, T. Orntoft, J. Lukas and J. Bartek DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis, *Nature* 434 (2005) 864-870.
- [9] V.G. Gorgoulis, L.V. Vassiliou, P. Karakaidos, P. Zacharatos, A. Kotsinas, T. Liloglou, M. Venere, R.A. Dittullo, Jr., N.G. Kastrinakis, B. Levy, D. Kletsas, A. Yoneta, M. Herlyn, C. Kittas and T.D. Halazonetis Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions, *Nature* 434 (2005) 907-913.
- [10] M. Audebert, L. Dolo, E. Perdu, J.P. Cravedi and D. Zalko Use of the gammaH2AX assay for assessing the genotoxicity of bisphenol A and bisphenol F in human cell lines, *Arch Toxicol* (2011).
- [11] M. Audebert, A. Riu, C. Jacques, A. Hillenweck, E.L. Jamin, D. Zalko and J.P. Cravedi Use of the gammaH2AX assay for assessing the genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in human cell lines, *Toxicol Lett* 199 (2010) 182-192.
- [12] K. Matsuzaki, A. Harada, A. Takeiri, K. Tanaka and M. Mishima Whole cell-ELISA to measure the gammaH2AX response of six aneugens and eight DNA-damaging chemicals, *Mutat Res* 700 (2010) 71-79.
- [13] E.P. Rogakou, D.R. Pilch, A.H. Orr, V.S. Ivanova and W.M. Bonner DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139, *J Biol Chem* 273 (1998) 5858-5868.
- [14] D.J. Smart, K.P. Ahmedi, J.S. Harvey and A.M. Lynch Genotoxicity screening via the gammaH2AX by flow assay, *Mutat Res* (2011).
- [15] T. Tanaka, H.D. Halicka, F. Traganos and Z. Darzynkiewicz Phosphorylation of histone H2AX on Ser 139 and activation of ATM during oxidative burst in phorbol ester-treated human leukocytes, *Cell Cycle* 5 (2006) 2671-2675.
- [16] G.P. Watters, D.J. Smart, J.S. Harvey and C.A. Austin H2AX phosphorylation as a genotoxicity endpoint, *Mutat Res* 679 (2009) 50-58.

- [17] C. Zhou, Z. Li, H. Diao, Y. Yu, W. Zhu, Y. Dai, F.F. Chen and J. Yang DNA damage evaluated by gammaH2AX foci formation by a selective group of chemical/physical stressors, *Mutat Res* 604 (2006) 8-18.
- [18] A. Crepet and J. Tressou Bayesian nonparametric model for clustering individual co-exposure to pesticides found in the French diet., *Bayesian analysis* 6 (2011) 127-144.
- [19] C. Dubuisson, S. Lioret, M. Touvier, A. Dufour, G. Calamassi-Tran, J.L. Volatier and L. Lafay Trends in food and nutritional intakes of French adults from 1999 to 2007: results from the INCA surveys, *Br J Nutr* 103 (2010) 1035-1048.
- [20] S. Lioret, M. Touvier, M. Balin, I. Huybrechts, C. Dubuisson, A. Dufour, M. Bertin, B. Maire and L. Lafay Characteristics of energy under-reporting in children and adolescents, *Br J Nutr* 105 (2011) 1671-1680.
- [21] STOCKHOLM CONVENTION ON PERSISTENT ORGANIC POLLUTANTS, http://www.pops.int/documents/convtext/convtext_en.pdf (1997).
- [22] US-EPA Tebufenpyrad, <http://www.epa.gov/opprd001/factsheets/tebufenpyrad.pdf> (2002).
- [23] V. Graillot, N. Takakura, L. Le Hegarat, V. Fessard, M. Audebert and J.P. Cravedi Genotoxicity of pesticide mixtures in the diet of French population, *Submitted*.
- [24] R. Huang, N. Southall, M.H. Cho, M. Xia, J. Inglese and C.P. Austin Characterization of diversity in toxicity mechanism using in vitro cytotoxicity assays in quantitative high throughput screening, *Chem Res Toxicol* 21 (2008) 659-667.
- [25] M. Xia, R. Huang, K.L. Witt, N. Southall, J. Fostel, M.H. Cho, A. Jadhav, C.S. Smith, J. Inglese, C.J. Portier, R.R. Tice and C.P. Austin Compound cytotoxicity profiling using quantitative high-throughput screening, *Environ Health Perspect* 116 (2008) 284-291.
- [26] CLH REPORT FOR TEBUFENPYRAD, http://echa.europa.eu/doc/consultations/cl/clh_tebufenpyrad.pdf (2011).
- [27] EFSA Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance tebufenpyrad, (2008).
- [28] Food, Safety, Commission and o. Japan Evaluation report of TOLFENPYRAD, http://www.fsc.go.jp/english/evaluationreports/pesticide/evaluationreport_tolfenpyrad.pdf (2004).
- [29] EFSA Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance fenpyroximate, EFSA scientific report 192 (2008) 1-100.
- [30] IPCS Fenpyroximate, <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v95pr06.htm> (1995).
- [31] T. Ide, H. Tsutsui, S. Kinugawa, H. Utsumi, D. Kang, N. Hattori, K. Uchida, K. Arimura, K. Egashira and A. Takeshita Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium, *Circ Res* 85 (1999) 357-363.
- [32] M.P. Murphy How mitochondria produce reactive oxygen species, *Biochem J* 417 (2009) 1-13.
- [33] T.B. Sherer, J.R. Richardson, C.M. Testa, B.B. Seo, A.V. Panov, T. Yagi, A. Matsuno-Yagi, G.W. Miller and J.T. Greenamyre Mechanism of toxicity of pesticides acting at complex I: relevance to environmental etiologies of Parkinson's disease, *J Neurochem* 100 (2007) 1469-1479.
- [34] Q. Chen, E.J. Vazquez, S. Moghaddas, C.L. Hoppel and E.J. Lesnefsky Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III, *J Biol Chem* 278 (2003) 36027-36031.

- [35] J.E. Lee, J.S. Kang, Y.W. Ki, S.H. Lee, S.J. Lee, K.S. Lee and H.C. Koh Akt/GSK3beta signaling is involved in fipronil-induced apoptotic cell death of human neuroblastoma SH-SY5Y cells, *Toxicol Lett* 202 (2011) 133-141.
- [36] A. Slaninova, M. Smutna, H. Modra and Z. Svobodova A review: oxidative stress in fish induced by pesticides, *Neuro Endocrinol Lett* 30 Suppl 1 (2009) 2-12.
- [37] W.G. Chung, C.L. Miranda and C.S. Maier Epigallocatechin gallate (EGCG) potentiates the cytotoxicity of rotenone in neuroblastoma SH-SY5Y cells, *Brain Res* 1176 (2007) 133-142.
- [38] S. Lee, E. Tak, J. Lee, M.A. Rashid, M.P. Murphy, J. Ha and S.S. Kim Mitochondrial H₂O₂ generated from electron transport chain complex I stimulates muscle differentiation, *Cell Res* 21 (2011) 817-834.
- [39] T.B. Sherer, R. Betarbet, C.M. Testa, B.B. Seo, J.R. Richardson, J.H. Kim, G.W. Miller, T. Yagi, A. Matsuno-Yagi and J.T. Greenamyre Mechanism of toxicity in rotenone models of Parkinson's disease, *J Neurosci* 23 (2003) 10756-10764.
- [40] L.F. Dong, V.J. Jameson, D. Tilly, J. Cerny, E. Mahdavian, A. Marin-Hernandez, L. Hernandez-Esquivel, S. Rodriguez-Enriquez, J. Stursa, P.K. Witting, B. Stantic, J. Rohlena, J. Truksa, K. Kluckova, J.C. Dyason, M. Ledvina, B.A. Salvatore, R. Moreno-Sanchez, M.J. Coster, S.J. Ralph, R.A. Smith and J. Neuzil Mitochondrial targeting of vitamin E succinate enhances its pro-apoptotic and anti-cancer activity via mitochondrial complex II, *J Biol Chem* 286 (2010) 3717-3728.
- [41] M. Iwanari, M. Nakajima, R. Kizu, K. Hayakawa and T. Yokoi Induction of CYP1A1, CYP1A2, and CYP1B1 mRNAs by nitropolycyclic aromatic hydrocarbons in various human tissue-derived cells: chemical-, cytochrome P450 isoform-, and cell-specific differences, *Arch Toxicol* 76 (2002) 287-298.
- [42] I.H. Ismail, T.I. Wadhra and O. Hammarsten An optimized method for detecting gamma-H2AX in blood cells reveals a significant interindividual variation in the gamma-H2AX response among humans, *Nucleic Acids Res* 35 (2007) e36.
- [43] P. Leopardi, E. Cordelli, P. Villani, T.P. Cremona, L. Conti, G. De Luca and R. Crebelli Assessment of in vivo genotoxicity of the rodent carcinogen furan: evaluation of DNA damage and induction of micronuclei in mouse splenocytes, *Mutagenesis* 25 (2010) 57-62.
- [44] B. Trouiller, R. Reliene, A. Westbrook, P. Solaimani and R.H. Schiestl Titanium dioxide nanoparticles induce DNA damage and genetic instability in vivo in mice, *Cancer Res* 69 (2009) 8784-8789.

Figure legends

Fig. 1. ICW of γ H2AX on the ACHN cell line. Each value represents the mean \pm SEM ($n \geq 3$) after 24 h of treatment with pesticides. Positive control was etoposide at 1 μ M. Significant differences were observed between DMSO controls and matched group (** $p \leq 0.01$).

Fig. 2. ICW of γ H2AX on the HepG2 cell line. Each value represents the mean \pm SEM ($n \geq 3$) after 24 h of treatment with pesticides. Positive control was B[a]P at 1 μ M. Significant differences were observed between DMSO controls and matched group (** $p \leq 0.01$).

Fig. 3. ICW of γ H2AX on the LS174T cell line. Each value represents the mean \pm SEM ($n \geq 3$) after 24 h of treatment with pesticides. Positive control was B[a]P at 1 μ M. Significant differences were observed between DMSO controls and matched group (** $p \leq 0.01$).

Fig. 4. ICW of γ H2AX on the SH-SY5Y cell line. Each value represents the mean \pm SEM ($n \geq 3$) after 24 h of treatment with pesticides. Significant differences were observed between DMSO controls and matched group (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$).

Fig. 5. Kinetics of H2AX phosphorylation on SH-SY5Y cell line treated with tebufenpyrad. Positive control was etoposide at 1 μ M. Each value represents the mean \pm SEM ($n=5$). Significant differences were observed between DMSO controls and matched group (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$).

Fig. 6. Chemical structures of pyrazole pesticides tested in this study. (A) Tebufenpyrad, (B) Bixafen, (C) Fenpyroximate, (D) Tolfenpyrad.

Fig. 7. ICW determination of γ H2AX and cytotoxicity of bixafen (A), fenpyroximate (B), tolfenpyrad (C) on the SH-SY5Y cell line after 24 h of treatment. Each value represents the mean \pm SEM ($n \geq 3$). Significant differences were observed between DMSO controls and matched group (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$).

Fig. 8. ICW determination of γ H2AX of tebufenpyrad, bixafen, fenpyroximate and tolfenpyrad on the Jurkat cell line. Each value represents the mean \pm SEM ($n \geq 3$) after 24 h of treatment on the Jurkat cell line. For genotoxicity, significant differences were observed between DMSO controls and matched group (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$). For viability, significant differences were observed between DMSO controls and matched group (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$).

Table 1. Category of the 14 active substances studied.

Active substance	Category	Chemical class
Acrinathrin	Acaricide, insecticide	Pyrethroid
Benalaxyl	Fungicide	Acylalanine
Bupirimate	Fungicide	Pyrimidinol
Chlordane	Insecticide	Cyclodiene, organochlorine
Dieldrin	Insecticide	Cyclodiene, organochlorine
Esfenvalerate	Insecticide	Pyrethroid
Heptachlor	Insecticide	Cyclodiene, organochlorine
Lindane	Insecticide	Organochlorine
Myclobutanil	Fungicide	Triazole
Penconazole	Fungicide	Triazole
Pirimicarbe	Insecticide	Carbamate
Propyzamide	Herbicide	Benzamide
Pyriproxyfen	Insecticide	Unclassified
Tebufenpyrad	Insecticide	Methyl-pyrazole

Table 2. Cytotoxicity of the 14 selected pesticides using the ICW technique on four human cell lines after 24 h of treatment. nd :Not determined. Each value represents the percentage of viability (mean \pm SD (n \geq 3)). Significant differences were observed between DMSO controls and matched group (* p \leq 0.05, ** p \leq 0.01).

	Concentration (μ M)	ACHN	HepG2	LS174T	SH-SY5Y
Esfenvalerate	0.1	105 \pm 12	112 \pm 38	91 \pm 17	100 \pm 7
	1	117 \pm 7	106 \pm 34	95 \pm 17	109 \pm 15
	10	105 \pm 12	89 \pm 19	75 \pm 8 *	97 \pm 12
	100	nd	nd	nd	nd
Benalaxyl	0.1	111 \pm 6	97 \pm 15	87 \pm 10	101 \pm 12
	1	112 \pm 3	96 \pm 17	92 \pm 23	110 \pm 18
	10	104 \pm 8	98 \pm 19	93 \pm 17	98 \pm 13
	100	nd	nd	nd	nd
Propyzamide	0.1	102 \pm 7	97 \pm 18	99 \pm 13	110 \pm 17
	1	104 \pm 3	95 \pm 20	87 \pm 11	108 \pm 22
	10	104 \pm 5	94 \pm 31	94 \pm 27	105 \pm 20
	100	96 \pm 1 *	98 \pm 6	75 \pm 32	105 \pm 25
Lindane	0,1	119 \pm 3	83 \pm 9	94 \pm 9	110 \pm 24
	1	125 \pm 23	87 \pm 9	102 \pm 13	102 \pm 13
	10	114 \pm 3 *	82 \pm 5 **	93 \pm 8	99 \pm 12
	100	nd	nd	nd	nd
Pirimicarbe	0.1	115 \pm 6	106 \pm 14	89 \pm 9	95 \pm 5
	1	111 \pm 7	103 \pm 16	93 \pm 17	94 \pm 10
	10	110 \pm 5	112 \pm 30	91 \pm 12	108 \pm 17
	100	99 \pm 6	99 \pm 17	92 \pm 11	110 \pm 17
Piriproxyfen	0.1	110 \pm 14	102 \pm 28	88 \pm 5	98 \pm 6
	1	107 \pm 4	104 \pm 21	88 \pm 6 *	88 \pm 14 *
	10	92 \pm 15	101 \pm 20	74 \pm 19	75 \pm 20 **
	100	nd	nd	nd	nd
Acrinathrin	0.1	107 \pm 7	97 \pm 15	98 \pm 17	96 \pm 2
	1	105 \pm 4	86 \pm 11 *	107 \pm 6	96 \pm 19
	10	92 \pm 7	96 \pm 18	86 \pm 3 **	91 \pm 22
	100	nd	nd	nd	nd
Bupirimate	0.1	114 \pm 12	99 \pm 18	94 \pm 3	94 \pm 6
	1	109 \pm 11	93 \pm 18	92 \pm 5	107 \pm 29
	10	108 \pm 17	95 \pm 25	71 \pm 15	92 \pm 26
	100	74 \pm 16	48 \pm 10 *	39 \pm 18 *	27 \pm 24 **
Myclobutanil	0.1	106 \pm 6	105 \pm 49	94 \pm 11	112 \pm 9
	1	104 \pm 6	91 \pm 35	86 \pm 20	99 \pm 20
	10	103 \pm 5	89 \pm 24	83 \pm 17	91 \pm 12
	100	86 \pm 2 **	77 \pm 17	57 \pm 7 **	88 \pm 21
Penconazole	0.1	102 \pm 5	105 \pm 30	94 \pm 12	100 \pm 11
	1	102 \pm 7	102 \pm 28	71 \pm 9 *	105 \pm 20
	10	98 \pm 8	98 \pm 26	72 \pm 19	101 \pm 21
	100	70 \pm 21	61 \pm 16	29 \pm 24 *	50 \pm 22
Chlordane	0.1	100 \pm 1	112 \pm 42	100 \pm 19	103 \pm 13
	1	98 \pm 7	99 \pm 35	93 \pm 18	106 \pm 14
	10	97 \pm 13	100 \pm 28	60 \pm 11 **	64 \pm 28 **
	100	nd	nd	nd	nd
Dieldrin	0.1	109 \pm 11	86 \pm 14	97 \pm 21	96 \pm 11
	1	109 \pm 14	84 \pm 20	88 \pm 7 *	101 \pm 24
	10	103 \pm 17	80 \pm 6 *	76 \pm 9 *	104 \pm 17
	100	nd	nd	nd	nd
Heptachlor	0.1	103 \pm 19	98 \pm 5	94 \pm 21	96 \pm 10
	1	100 \pm 16	97 \pm 27	91 \pm 15	109 \pm 24
	10	92 \pm 16	89 \pm 12	89 \pm 9	90 \pm 19
	100	nd	nd	nd	nd
Tebufenpyrad	0.01			82 \pm 11	
	0,1	106 \pm 25	87 \pm 20	70 \pm 29	105 \pm 18
	1	76 \pm 25	74 \pm 18 *	65 \pm 19 **	109 \pm 18
	10	78 \pm 20	65 \pm 22 *	49 \pm 15 **	103 \pm 13
	100	nd	nd	nd	nd

Etoposide	1	90 ± 8		76 ± 6 **
Benzo[a]pyrene	1		92 ± 14	90 ± 19

Fig. 1

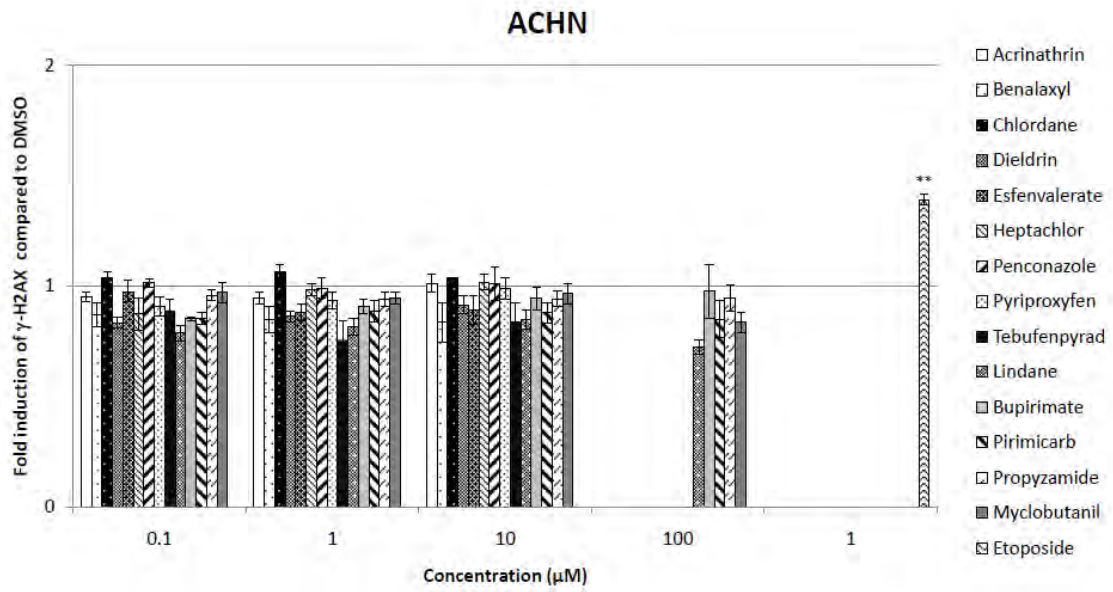


Fig. 2

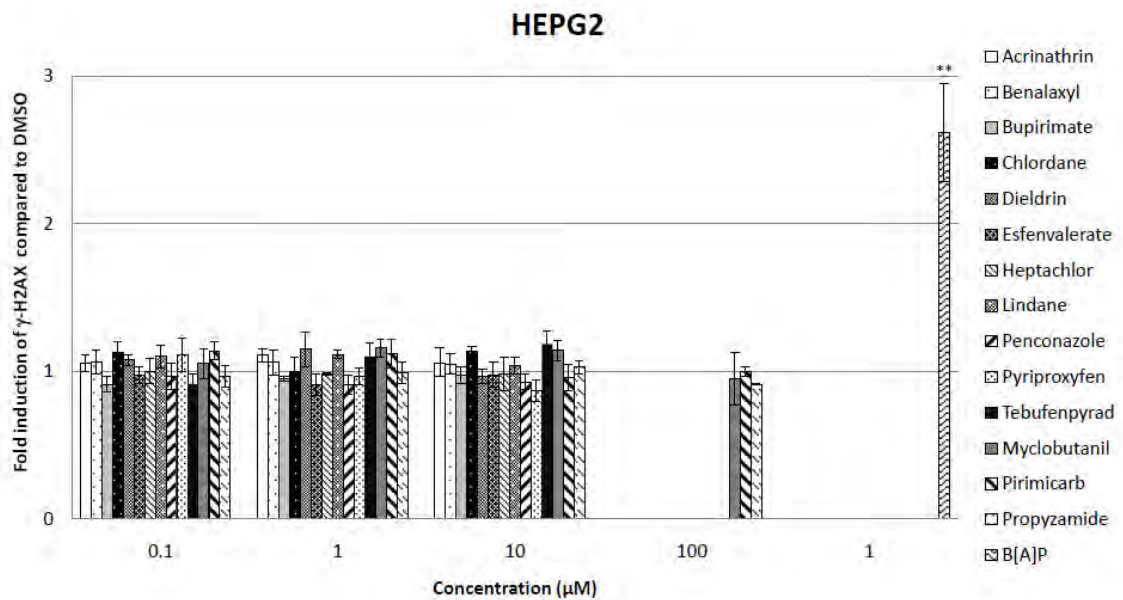


Fig. 3

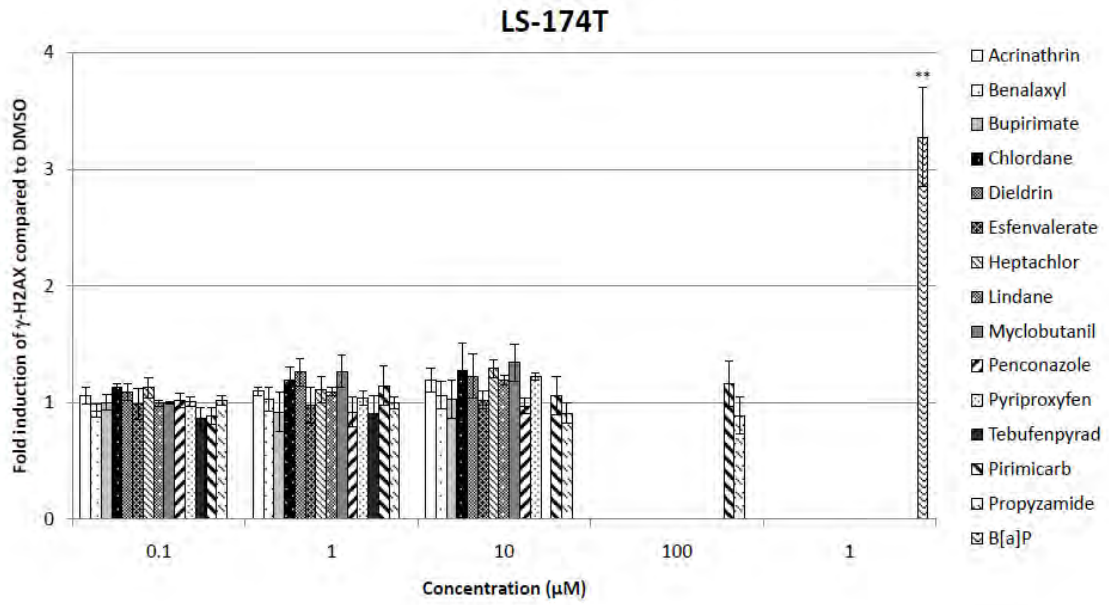


Fig. 4

SHSY-5Y

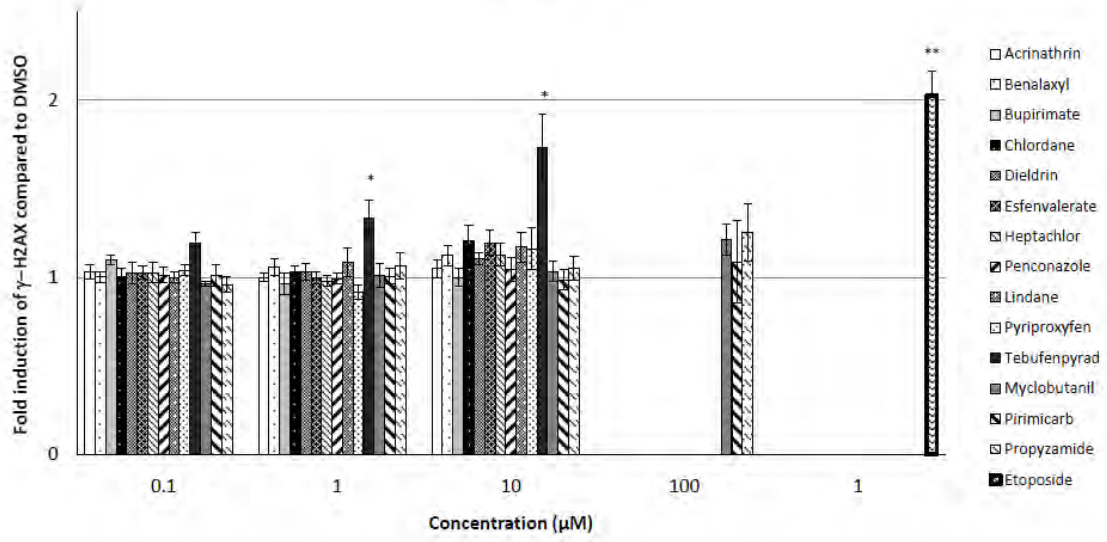


Fig. 5

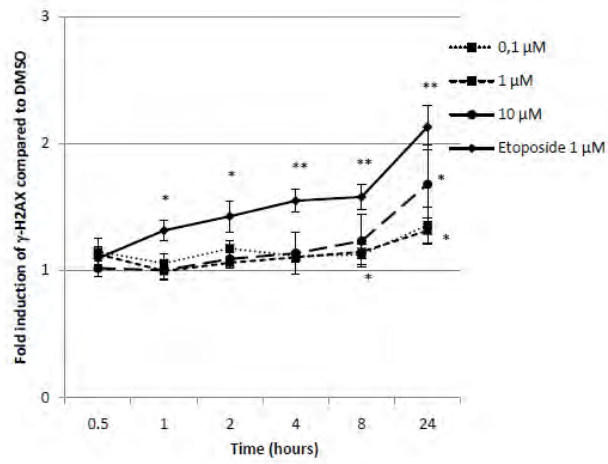


Fig. 6

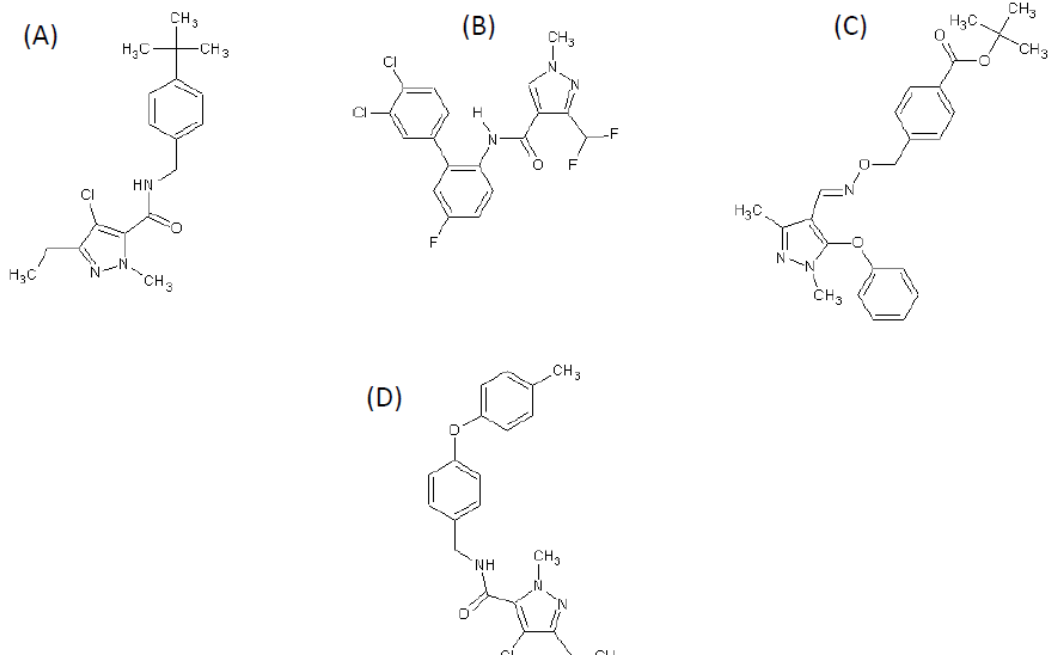


Fig. 7

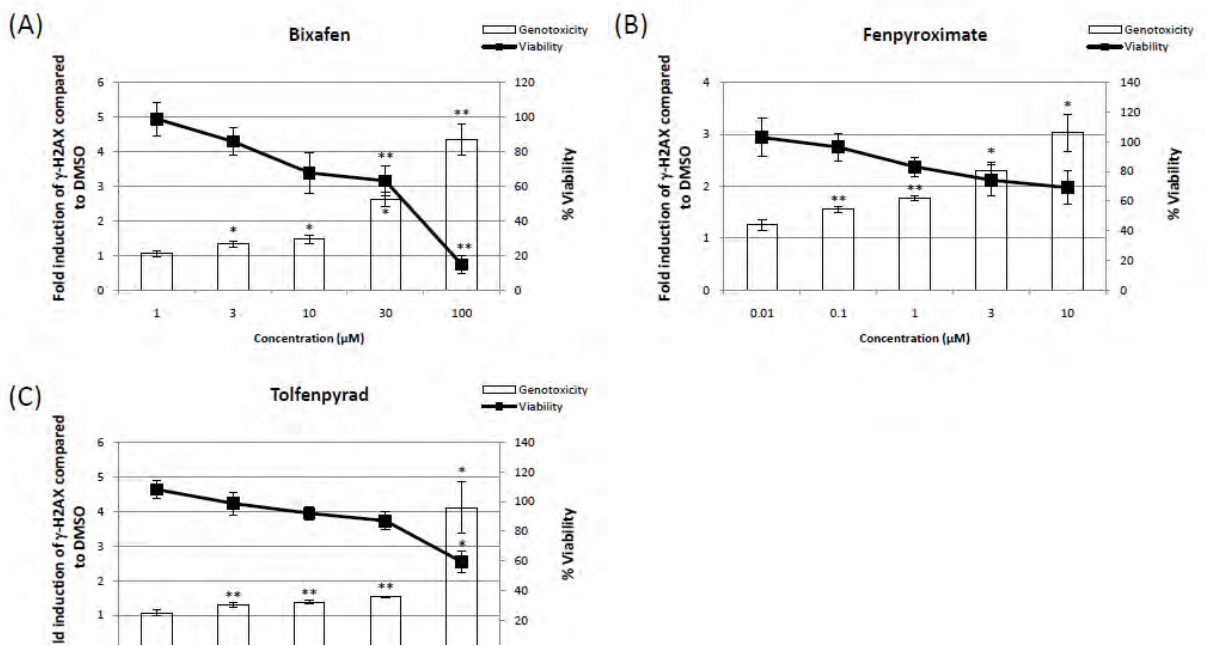
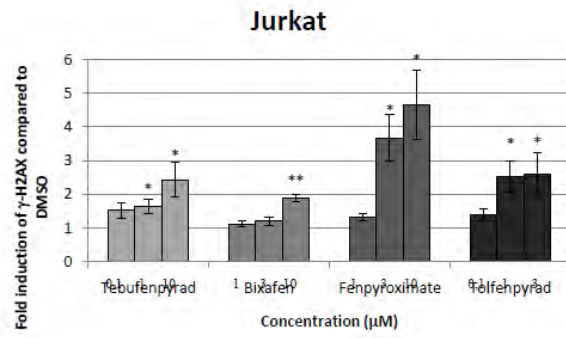


Fig. 8



Discussion

Cette étude a tout d'abord permis d'améliorer la technique d'ICW avant de faire l'étude du potentiel génotoxique des sept mélanges. En effet, dans cette étude deux nouvelles lignées cellulaires (Jurkat et SH-SY5Y) qui n'avait pas été encore testées au laboratoire ont été mises au point, notamment pour le taux d'ensemencement, le choix de la technique de fixation des cellules. Le potentiel génotoxique des 14 pesticides a ensuite été testé sur les quatre lignées cellulaires en utilisant le test γ -H2AX.

Sur les quatre lignées cellulaires, seul le tebufenpyrad induit significativement de façon dose dépendante la phosphorylation de γ -H2AX et ceci uniquement sur la lignée SH-SY5Y à partir de 1 μ M. Le tebufenpyrad a été testé à des temps d'incubation allant de 30 min à 24h et induit des cassures d'ADN dès 30 min aux fortes concentrations, ce qui pourrait alors suggérer une implication des ERO dans la formation des dommages. De plus, au bout d'une heure de traitement, la forme phosphorylée de l'histone n'est plus observée ce qui suggère la mise en place d'un système de réparation des dommages par les cellules, puis au-delà d'une heure il est observé de nouveau de nombreuses CDB.

Le tebufenpyrad est un insecticide qui possède également une activité acaricide, de la classe des pyrazoles. Les rapports de l'EFSA ainsi que de l'EPA n'indiquent pas d'effet génotoxique de cette substance avec les différents tests génotoxiques réglementaire (CLH 2011; EFSA 2008b; US-EPA 2002). Néanmoins, ces rapports font état d'une étude réalisée *in vitro* sur des lymphocytes humains qui montre qu'après exposition au tebufenpyrad des dommages sur les chromatides sont observés, en absence d'enzyme du métabolisme. Le tebufenpyrad a donc été testé sur une lignée lymphocytaire humaine (Jurkat) qui exprime peu d'enzymes du métabolisme (Rodriguez-Antona et al. 2007). Après 24 h d'exposition, le tebufenpyrad induit sur Jurkat également une phosphorylation d'H2AX dose-dépendante. Suite à ces résultats, la génotoxicité de trois autres substances de la même famille chimique que le tebufenpyrad a été testée sur les deux lignées cellulaires (Jurkat et SH-SY5Y). Les substances choisies étaient le bixafen, le fenpyroximate et le tolfenpyrad (qui sont respectivement un fongicide, un acaricide et un insecticide). Le fenpyroximate est actuellement autorisé sur le marché Européen et le bixafen est en cours d'évaluation. Seul le tolfenpyrad n'est pas autorisé en Europe pour le traitement des cultures. Les résultats montrent que sur SHSY-5Y, les trois méthyl-pyrazoles sont des composés plus cytotoxiques que le tébufenpyrad. Le composé le plus cytotoxique est le tolfenpyrad, puis le fenpyroximate et enfin le moins cytotoxique est le bixafen. Nos résultats confirment ceux d'une précédente étude réalisée sur une autre lignée neuroblastique

humaine (SK-N-MC), qui montre que le fenpyroximate est plus cytotoxique que le tébufenpyrad (Sherer et al. 2007). Il est également observé un effet génotoxique de ces trois méthyl-pyrazoles sur la lignée Jurkat, de façon dose dépendante et à faibles concentrations (0,01 μ M pour le tolfenpyrad). En plus d'avoir une structure chimique comparable, ces quatre substances ont le même mode d'action phytopharmaceutique et sont capables d'inhiber la chaîne respiratoire mitochondriale. Il a été démontré que l'inhibition de chaîne respiratoire mitochondriale augmente la production d'ERO dans la cellule (Chen et al. 2003; Ide et al. 1999; Murphy 2009; Sherer et al. 2007). Cette production d'ERO pourrait donc être à l'origine des dommages à l'ADN.

Ces résultats montrent que le test H2AX est adapté à des cellules en suspension, et confirme qu'il permet d'observer différents types de dommages (adduits à l'ADN, dommages oxydatifs).

Chapitre VI :

Discussion et perspectives

Plusieurs études montrent que la population générale est exposée indirectement à de nombreux pesticides, par la voie alimentaire (ANSES 2011a; EFSA 2008c; EFSA 2011a). Il est rappelé dans un récent rapport de l'EFSA que des résidus de pesticides sont présents dans 39 % des échantillons analysés à travers l'Europe en 2009, mais dont 1,2 % seulement dépassent les limites autorisées (EFSA 2011a). Traditionnellement, l'évaluation combinée des risques des pesticides se fait à partir des évaluations des substances prises individuellement. Très souvent, l'évaluation combinée concerne des pesticides ayant le même mode d'action, ou de même famille chimique et conduit à déterminer des facteurs d'équivalence, permettant ensuite d'exprimer les différents résidus par rapport à une substance de référence, considérée comme la plus toxique (Boon et al. 2008; Caldas et al. 2006a; Caldas et al. 2006b).

Le but de ma thèse était de tester si des mélanges de pesticides obtenus à partir du modèle statistique développé à l'ANSES, présentaient des effets génotoxiques combinés. Les travaux présentés dans ce manuscrit permettent d'apporter quelques éléments de réponse. Dans un premier temps nous nous sommes attachés à identifier les pesticides présents en même temps dans l'alimentation, à l'aide d'une méthode statistique. Dans un deuxième temps, le danger, qui correspond aux possibles effets combinés, a été analysé. L'effet retenu dans le cadre de ce travail est la génotoxicité, qui est l'étude des dommages de l'ADN, causés de façon directe ou indirecte par les pesticides. La dernière étape du projet consistant à caractériser le risque, n'a pas véritablement été abordée dans ce projet, mais des hypothèses ont cependant été émises.

De nombreuses études ont été effectuées pour évaluer l'exposition de la population générale aux pesticides (EFSA 2008d). Cette évaluation ne peut se faire directement à partir de biomarqueurs, ni à l'aide de repas dupliqués, dû aux coûts engendrés par ces études. L'évaluation de l'exposition est alors basée sur des données provenant d'enquêtes de consommation, combinées aux données sur les teneurs en résidus de pesticides dans les denrées et l'eau potable. Dans notre étude, nous disposons d'une enquête nationale regroupant les consommations individuelles de la population générale, qui a été réalisée en 2006 par l'ANSES. Dans le cas des pesticides, la pression parasitaire et biologique est fortement liée au climat. En utilisant la base de données des programmes de surveillance et de contrôle de la DGAL, DCCRF et des données SISE-eaux de 2006, les variations saisonnières et climatiques ont été prises en compte. À travers cette base de données, il a pu être constaté que pour de nombreuses substances ou denrées, les LMR ont été respectées (DGCCRF 2008). La même observation a été faite à l'échelle de l'ensemble des pays de l'Union Européenne (EFSA 2008c).

Le choix des données, ainsi que la manière de les combiner (association des aliments en groupe, données agrégées, désagrégées, traitement de la censure...) peut influencer les résultats des valeurs

d'exposition (Tressou et al. 2004a; Tressou et al. 2004b; van der Voet et al. 2009). De nombreuses données retrouvées sont dites « censurées », c'est-à-dire que les valeurs indiquées sont inférieures, soit aux limites de détection (LOD), soit aux limites de quantification (LOQ). Ceci est expliqué par les méthodologies de détection appliquées par les laboratoires d'analyses (méthode d'analyse multirésidus) à partir d'une même denrée.

Lorsque les données de censures sont importantes, l'EFSA préconise de tenir compte de ces valeurs à l'aide de courbes de distribution (EFSA 2008d). Dans notre étude, la première hypothèse conduisait à tirer aléatoirement une valeur entre 0 et la valeur de censure (c'est-à-dire soit entre 0 et LOD si le pesticide n'était pas détecté, soit entre la LOD et la LOQ si le pesticide était retrouvé mais non quantifié). Cette hypothèse a montré de fortes corrélations entre l'exposition et les valeurs de censure et donc une forte homogénéisation des valeurs d'exposition. C'est pourquoi, une deuxième hypothèse a été proposée, conduisant à fixer la valeur de censure à 0. Le choix des hypothèses de travail concernant les valeurs à appliquer à ces données de censure sont importantes, car que l'on choisisse une protection basse (en remplaçant la valeur par 0) ou haute (entre 0 et la LOD/LOQ), les scénarios choisis influencent de manière importante l'évaluation de l'exposition. C'est le cas dans notre étude : dans l'exemple du tébufenpyrad, la valeur d'exposition moyenne de la population générale, obtenue à partir du tirage aléatoire est de 0,166 $\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{j}$ et de 0,002 $\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{j}$ avec la deuxième hypothèse, ce qui est 100 fois plus faible. Ce facteur 100 est observable également pour les 14 autres pesticides sélectionnés (Chapitre III) (données non présentées) (Crépet and Tressou 2011; Crépet A. et al. submitted). Plus de 99 % des valeurs concernant le tébufenpyrad sont des valeurs de censures. Ce pesticide a été retenu par le modèle car, d'une part il est présent dans quelques échantillons à de fortes concentrations, mais également parce que les valeurs de censures sont élevées. L'étude EAT2 réalisée de 2006 à 2010, montre qu'il a été détecté seulement dans 0,24 % des échantillons analysés de fruits, mais à des quantités trop faibles pour être quantifiées. Les teneurs de pesticides varient d'une année sur l'autre due à une pression parasitaire différente, selon les conditions climatiques. Les résultats obtenus avec EAT 2 ne peuvent alors être comparés à ceux des plans nationaux de surveillance et de contrôles de 2006, d'une part parce que l'année est différente, d'autre part, parce que le nombre d'échantillons analysés est beaucoup plus faible. Néanmoins, elle donne une indication sur les teneurs retrouvées l'année suivante et montre que pour plus de 99 % des échantillons analysés, les valeurs de contamination retrouvées correspondent à des valeurs censurées, comme c'est le cas dans notre étude. Ces deux études combinées montrent alors que dans certains cas, le tirage aléatoire tenant compte des valeurs censurées, peut surestimer l'exposition. L'hypothèse de censure fixée à 0 a alors été retenue, car l'analyse de la co-exposition fait ressortir les pesticides pour lesquelles des valeurs ont été observées et non pas ceux pour lesquelles la LOD ou LOQ est la plus élevée.

Le nombre de mélanges obtenu avec l'hypothèse de censure entre les adultes et les enfants est de 7, composés de 2 à 6 pesticides. Plusieurs facteurs peuvent expliquer ces résultats. Premièrement, parmi les substances actives formant un mélange, certains composants de ce mélange ont pour but de protéger la culture d'un même type de maladie (cas du penconazole et du quinoxyfen, présents dans le mélange 3 utilisés pour traiter par exemple l'oïdium, ou du chlorprofam et de l'hydrazide maléique, utilisés tous deux comme anti-germinatif des pommes de terre). L'autre facteur, est l'utilisation de préparations commerciales, contenant plusieurs substances actives en association. C'est le cas du cyprodinil et du fludioxonil, qui ont été déterminés dans le mélange 4 : plus de 50 % des préparations commerciales autorisées en France contenant du cyprodinil, contiennent également du fludioxonil. Ces observations soulignent la cohérence des résultats obtenus.

Il est admis par la communauté scientifique que les agents génotoxiques n'ont pas d'effet seuil, c'est-à-dire qu'un seul dommage de l'ADN peut entraîner une mutation et induire après plusieurs divisions cellulaires un processus de cancérogenèse. C'est pourquoi les pesticides qui sont des génotoxiques avérés, ne sont pas autorisés par le règlement européen de mise sur le marché des substances actives (Règlement 2009).

Des tests de génotoxicité ont été développés pour détecter de façon précoce des substances susceptibles d'engendrer un processus de cancérogenèse, dont l'étude est contraignante par sa durée, par son coût et par l'utilisation d'un nombre important d'animaux. Cependant, ces tests ne sont pas une alternative aux études de cancérogenèse, parce qu'il existe des agents cancérogènes non génotoxiques et qu'aucun test ne détecte les cancérogènes responsables de modifications épigénétiques (Zhou et al. 2006). L'impossibilité de disposer d'un test de génotoxicité universel capable de révéler tous les types de dommages à l'ADN, a conduit les instances réglementaires à recommander une batterie de tests génotoxiques pour l'évaluation des substances chimiques. La plupart des tests recommandés, utilisent des modèles biologiques, éloignés de l'homme (bactérie pour le test d'Ames, lignées cellulaires d'origine animale), et ne tiennent pas forcément compte de la biotransformation des composés. Par ailleurs, pour ne pas favoriser la découverte de faux positifs, il est nécessaire de réaliser un test de viabilité cellulaire en parallèle (Audebert et al. 2011; Barnes et al. 2010; EFSA 2011c). Parmi les tests réglementaires, deux tests génotoxiques au minimum sont préconisés par l'EFSA, (test d'Ames et micronoyau) (EFSA 2011b).

Afin de permettre le criblage du nombre important de substances seules ou en mélanges dont nous souhaitons évaluer le potentiel génotoxique, nous avons opté pour un nouveau test, récemment mis

au point au laboratoire (γ -H2AX), qui est non réglementaire mais qui possèdent de nombreux avantages : il s'agit d'un test sensible car il permet d'observer de nombreux dommages à l'ADN, conduisant *in fine* à des CDB d'ADN, tels que les adduits, les lésions oxydatives. Comparé aux autres tests, H2AX montre une bonne corrélation avec les résultats du test du micronoyau (Mondal et al. 2011; Scarpato et al. 2011; Smart et al. 2011; Watters et al. 2009; Yoshikawa et al. 2009). Il a été en effet montré, que des cellules micronuclées contenaient également des foyers de γ -H2AX (Huang et al. 2011). L'avantage d'H2AX comparé au test des comètes, est d'être plus rapide à mettre en œuvre et plus sensible (Audebert et al. 2011; Graillet et al. 2012; Ismail et al. 2007; Leopardi et al. 2010; Trouiller et al. 2009). Ceci s'explique par le fait qu'il suffit d'une seule CDB d'ADN pour que le signal s'amplifie autour de la cassure et ainsi que de nombreuses molécules d'H2AX soient phosphorylées. La détection spécifique de γ -H2AX par des anticorps spécifiques permet alors d'observer un fort signal de fluorescence. Dans le cas du test des comètes, il faut 5 à 10 cassures par noyau pour commencer à observer les fragments d'ADN et voir l'apparition d'une comète. De plus, la sensibilité est augmentée par le nombre de cellules étudiées (80 000 cellules pour le test H2AX contre 200 à 500 pour le test des comètes). De ce fait, le test H2AX est mieux adapté aux faibles doses, est reproductible et plus rapide, car utilisable en microplaques 96 puits. Il permet également d'observer en parallèle la viabilité cellulaire, ce qui permet de limiter le nombre de faux-positifs. De plus, le test H2AX est un marqueur précoce des CDB d'ADN et surtout la phosphorylation a été observée dans des cellules pré-cancéreuses (Bartkova et al. 2005; Gorgoulis et al. 2005). Il peut être réalisé sur un large éventail de types cellulaires, aussi bien avec des cellules adhérentes, qu'avec des cellules en suspension, ce qui en fait un atout pour effectuer du biomonitoring.

En revanche, pour obtenir une meilleure sensibilité du test, les cellules doivent être en phase exponentielle de croissance, ce qui le rend mal adapté à la détection des lésions de l'ADN par la technique d'ICW sur des cellules telles que les hépatocytes en culture primaire par exemple. Par ailleurs, il s'agit d'un test récent, qui n'est pas réglementaire. Pour qu'un test le soit, trois principaux critères sont pris en compte : la sensibilité, la spécificité et la prédictivité. L'ECVAM (European Centre for the Validation of Alternative Methods) a pour mission de promouvoir l'élaboration, la validation et la reconnaissance internationale de méthodes d'essai alternatives, dont notamment la validation de méthodes de substitution pour l'évaluation du risque des xénobiotiques. Dans ce cadre, l'ECVAM a publié dans une étude, une liste référant 62 produits chimiques, permettant la validation de nouveaux tests de génotoxicité *in vitro* (Kirkland et al. 2008). Parmi ces 62 substances, trois groupes ont été identifiés (substances génotoxiques, non génotoxiques et non génotoxique sur le test d'Ames). La sensibilité correspond alors au nombre de substances retrouvées positives par le test en cours de validation comparée au test de référence déjà réglementaire. La prédictivité est obtenue à partir des deux premiers groupes (génotoxiques et non génotoxiques) et correspond au pourcentage

de substances où les résultats du test sont corrects par rapport aux résultats obtenus par le test de référence. Enfin, la spécificité est obtenue à partir du deuxième groupe de substance (non génotoxique), qui correspond au pourcentage de données positives et permet ainsi de dénombrer les faux positifs.

Des études inter-laboratoire doivent ensuite être menées pour vérifier la bonne reproductibilité. Une étude a d'ores et déjà montré une forte sensibilité mais également une bonne spécificité de ce test (Smart et al. 2011). Par ailleurs, une étude au laboratoire est actuellement menée pour démontrer une bonne spécificité et prédictivité de ce test par la technique d'ICW.

Dans ce travail, il a été montré à l'aide du test H2AX que sur les 37 pesticides testés seuls et/ou en mélange, six induisaient des CDB d'ADN avec des mécanismes d'action différents.

L'étude du potentiel génotoxique des 14 pesticides seuls a montré sur les quatre lignées cellulaires testées que seul le tébufenpyrad induisait une phosphorylation d'H2AX sur la lignée cellulaire SH-SY5Y. Afin de déterminer le mécanisme de génotoxicité associé au tébufenpyrad, d'autres pesticides ayant une structure chimique similaire ont été testés sur les lignées cellulaires SH-SY5Y et Jurkat. Les quatre composés méthyl-pyrazoles testés (tébufenpyrad, bixafen, tolfenpyrad et fenpyroximate) induisent une phosphorylation d'H2AX sur ces deux lignées cellulaires humaines.

Dans une étude préliminaire menée au laboratoire, l'étude du potentiel génotoxique du fipronil à l'aide du test H2AX sur la lignée Jurkat n'a pas montré d'induction de CDB d'ADN (données non présentées). Le fipronil est un insecticide de la famille des phényl-pyrazoles qui est autorisé sur le marché Européen (EFSA 2006). En France, cette substance a fait en 2004 l'objet d'importantes restrictions d'emploi pour son utilisation en protection des cultures. En effet, dans le cadre de l'évaluation communautaire de la toxicité du fipronil, les autorités françaises ont transmis à l'EFSA un projet de monographie concluant à la non-inscription du fipronil à l'annexe I de la directive 91/414/CE « compte tenu des préoccupations majeures pour l'environnement et les espèces sauvages (organismes aquatiques, abeilles, oiseaux et mammifères sauvages) ». Ainsi, les autorisations d'utilisation des préparations commerciales ont été progressivement retirées. À l'heure actuelle, cette substance est autorisée en France uniquement comme médicament vétérinaire et pour le traitement des locaux de stockage (base de données e-phy). Les quatre méthyl-pyrazoles (tébufenpyrad, bixafen, tolfenpyrad et fenpyroximate) ont une structure chimique similaire au fipronil, hormis un groupement méthyl présent sur le noyau pyrazole. Le mode d'action du fipronil est également différent des quatre autres et consiste à inhiber le récepteur GABA (EFSA 2006). Ces éléments suggèrent que la structure chimique des méthyl-pyrazoles ainsi que le mode d'action qui leur est associé pourraient être à l'origine de leur génotoxicité. En effet, tous les quatre sont des

inhibiteurs de la chaîne respiratoire mitochondriale des insectes et des acariens, dont les effets ne sont pas spécifiques à ces espèces. Il a été montré en effet dans certains rapports ou études, que certains de ces composés sont également capables d'interagir avec la chaîne respiratoire mitochondriale de cellules humaines (Japan 2004; Sherer et al. 2007).

Il a été par ailleurs observé dans cette étude que les méthyl-pyrazoles sont plus cytotoxiques sur la lignée SH-SY5Y que d'autres insecticides ou fongicides (la cytotoxicité des méthyl-pyrazoles est observée à des concentrations inférieures à 10 μ M alors qu'elle est observée entre 10 et 100 μ M pour le bupirimate, penconazole, pyriproxifen et myclobutanil). Les méthyl-pyrazoles se sont avérés plus cytotoxiques que les autres pesticides testés, probablement en raison de leur action inhibitrice de la chaîne respiratoire mitochondriale. Des études ont montré également que l'inhibition de la chaîne respiratoire mitochondriale augmentait la production d'ERO dans la cellule (Chen et al. 2003; Ide et al. 1999; Murphy 2009; Sherer et al. 2007), ce qui pourrait alors conduire à de nombreux dommages de l'ADN. Aux fortes concentrations, les CDB observées résulteraient alors d'une forte production d'ERO, ayant pour conséquence une activation du processus d'apoptose (données non présentées). Pour confirmer cette hypothèse, un dosage des ERO après traitement des cellules SH-SY5Y à de fortes concentrations a été réalisé à des temps courts (inférieurs à 8h), mais n'a pas montré de résultats reproductibles. Cependant une expérience réalisée à de faibles concentrations durant 24 h de traitement sur cette même lignée a révélé la présence d'ERO. Afin de confirmer ces résultats préliminaires et de conforter notre hypothèse, d'autres expériences devront être menées sur la lignée SH-SY5Y mais également sur la lignée Jurkat.

Le tébufenpyrad induit des CDB d'ADN sur des lignées cellulaires dont les capacités métaboliques sont réduites (SH-SY5Y et Jurkat) (Rodriguez-Antona et al. 2007; Valdiglesias et al. 2011a; Valdiglesias et al. 2011b). Il a alors été émise l'hypothèse que ce composé pouvait être métabolisé par les lignées cellulaires LS-174T et HepG2. Les métabolites ainsi formés, ne sont peut être plus capables d'interagir avec la chaîne respiratoire mitochondriale des cellules et ne génèrent donc plus d'ERO. Ce phénomène est à rapprocher du mécanisme de résistance des acariens à ce pesticide qui repose sur l'expression accrue d'enzymes du métabolisme chez ces espèces (Kim et al. 2004; Van Leeuwen et al. 2005; Van Pottelberge et al. 2009).

Le fenpyroximate, le tébufenpyrad ainsi que le tolfenpyrad ne sont pas considérés comme génotoxiques par les instances réglementaires (EFSA 2008a; EFSA 2008b; Japan 2004). Une étude a cependant montré que le tébufenpyrad était clastogène *in vitro* sur des lymphocytes sans ajout de S9 (CLH 2011). Les données sur la génotoxicité du bixafen ne sont pour l'instant pas disponibles dans la littérature. À l'heure actuelle, seuls le tébufenpyrad et le fenpyroximate sont autorisés en France avec seulement deux préparations autorisées (Masai et Ortus (base de données e-phy)). Ces

substances actives ont été testées à l'aide de la batterie de tests réglementaires, qui n'inclut pas l'étude de lignées cellulaires neuronales, ni le test H2AX. Nos résultats posent la question du choix de ces tests, de l'interprétation des résultats qu'ils produisent et des modèles cellulaires qu'il convient de mettre en œuvre.

Le tébufenpyrad, est une substance peu retrouvée dans l'alimentation en 2006, du fait probablement d'une faible rémanence dans les aliments et d'une autorisation sur un nombre limité de cultures (base de données e-Phy). Ainsi, il n'a pas été retrouvé dans les mélanges définis par l'hypothèse de la censure à 0, du fait d'un grand nombre de valeurs censurées. Le fenpyroximate, quant à lui est autorisé sur le marché depuis 2005 uniquement sur les cultures de pommiers et de pêchers (Base de données e-phy). Cette substance venant d'être mise sur le marché, ne figure pas dans les plans de surveillance et de contrôles de 2006 et nous n'avons pas d'indication concernant l'exposition de la population française à ce pesticide. Cependant, l'étude EAT2, réalisée entre 2006 et 2010, montre qu'il n'a pas été détecté dans les 75 échantillons analysés. Comme le tébufenpyrad, il est utilisé sur les cultures pour traiter la présence d'acarien rouge. Du fait que ces deux substances ne sont pas très utilisées et donc peu retrouvées, la probabilité pour que la population générale soit exposée à ces deux composés est faible. En revanche, dans le cas d'une exposition professionnelle, les agriculteurs sont directement exposés à ces pesticides, par différentes voies d'expositions (respiratoires, cutanée...), à des doses d'exposition plus importantes que la population générale (surtout si les moyens de protection précautionnés n'ont pas été utilisés (Delhomme et al. 2011; Li et al. 2011)). De nombreuses études ont montré une corrélation entre l'exposition professionnelle aux pesticides et une augmentation des cancers hématopoïétiques et cérébraux (Merhi et al. 2007; Weichenthal et al. 2010). À ce jour, aucune donnée dans la littérature sur l'exposition des agriculteurs aux méthyl-pyrazoles n'est disponible. D'après notre étude, les méthyl-pyrazoles induisent des dommages à l'ADN sur les lignées cellulaires SH-SY5Y et Jurkat. Il ne peut alors être exclu que ces composés puissent, si les dommages ne sont pas correctement réparés, induire un processus de cancérogenèse et présenter alors un risque pour la santé des professionnels.

Notre étude sur les méthyl-pyrazoles peut apporter de nouvelles données concernant la génotoxicité du bixafen sur laquelle rien n'a été publié à ce jour. Cette substance vient d'être évaluée par un des États membres Européen (Royaume-Uni), pour être autorisée sur les cultures céréalières. De même, nos données peuvent compléter le dossier d'évaluation du tolfenpyrad, qui n'est à ce jour pas autorisé en Europe. Enfin, les éléments sur l'utilisation du tébufenpyrad, nuancent les premiers résultats de calculs d'exposition et vont dans le sens d'une faible probabilité d'exposition pour la population générale. En revanche, nos résultats méritent que le risque lié à l'utilisation des méthyl-

pyrazoles par les professionnels soit considéré avec attention, en s'appuyant sur des données complémentaires de génotoxicité *in vivo*.

Dans l'étude des potentiels effets génotoxiques des mélanges, seul le mélange 4 composé de cinq pesticides est génotoxique et ceci uniquement sur la lignée HepG2. Il a été suggéré qu'un ou plusieurs métabolites formés étaient génotoxiques puisqu'il n'induit pas de dommage sur les deux autres lignées cellulaires, n'exprimant pas ou peu d'enzymes du métabolisme (ACHN et SH-SY5Y). De nouveau, cet exemple illustre l'intérêt de disposer de plusieurs lignées ayant des propriétés métaboliques différentes pour tester les substances et éventuellement éviter de faux négatifs. La possibilité d'obtenir des résultats faux-positifs dans des cellules HepG2 est faible (Kirkland et al. 2007), ce qui en fait un modèle pertinent pour l'étude des composés génotoxiques bio-transformés. Une étude *in vivo* devra par la suite être menée, afin d'une part de confirmer le modèle d'étude HepG2, d'autre part confirmer la génotoxicité de ces composés ainsi que l'effet synergique à faible concentration du mélange.

Dans le cadre de la réglementation, quelques lignées cellulaires seulement sont préconisées (CHO, lymphocytes humains,...), pour un type de dommage recherché. Les résultats présentés dans notre étude montrent que six pesticides induisent des CDB d'ADN, mais uniquement sur une ou deux lignées cellulaires. Or toutes les cellules ne présentent pas les mêmes caractéristiques (Huang et al. 2008; Xia et al. 2008). Il est donc nécessaire de disposer de tests de génotoxicité qui soient à la fois sensibles et qui permettent de tester de nombreuses molécules à haut débit sur plusieurs lignées cellulaires. Il serait alors utile d'élargir le type de lignées cellulaires testées en privilégiant celles d'origine humaine, pour être le plus représentatif possible des cibles potentielles des contaminants alimentaires. Toutefois, ces lignées immortalisées présentent des limites. Elles ont des caractéristiques fonctionnelles parfois éloignées de celles des cellules originelles et ne bénéficient pas de leur environnement initial et des interactions avec d'autres types cellulaires. L'utilisation de lignées cellulaires ne permet pas non plus d'obtenir le même niveau d'intégration de l'organisme entier ce qui conduit à ne pas savoir comment les composés sont absorbés, distribués et parfois même métabolisés.

L'analyse du potentiel génotoxique des substances seules du mélange 4 (iprodione, procymidone, λ -cyhalothrine, cyprodinil et fludioxonil) a montré que seuls le cyprodinil et le fludioxonil étaient génotoxiques à partir de 20 μ M et 4 μ M respectivement. D'après les rapports de l'EFSA, le cyprodinil ainsi que le fludioxonil ne sont pas considérés comme génotoxiques (EFSA 2005a; EFSA 2007). Pourtant ce même rapport indique que le fludioxonil produit des aberrations

chromosomiques sur des cellules CHO ainsi qu'une synthèse non programmée d'ADN sur des hépatocytes primaires de rat. De même, une étude *in vitro* utilisant le test d'Ames et SOS chromotest a montré un potentiel mutagène de ces deux composés (Isidori et al. 2009).

Les trois autres substances du mélange (iprodione, procymidone, λ -cyhalothrine) ont uniquement été testées aux concentrations présentes dans le mélange. Il n'est alors pas exclu qu'elles puissent également avoir un potentiel génotoxique à des concentrations supérieures. D'autres d'expériences sur la lignée HepG2 devront être menées, pour s'assurer qu'à des concentrations supérieures à 20 μ M, celles-ci n'induisent pas de CDB. La base de données ToxCast (<http://www.epa.gov/ncct/toxcast/>) a pour but de regrouper les résultats des tests toxicologiques obtenus au cours de l'évaluation de nombreuses substances chimiques. Le test Cellumen phospho-H2AX, qui détecte les foci d'H2AX dans chaque cellule, a été utilisé pour cribler de nombreuses substances et les résultats de trois d'entre elles y sont disponibles (cyprodinil, fludioxonil et iprodione). Ce test a été réalisé sur la lignée HepG2 durant différentes périodes de traitement (1, 24 et 72 h). Dans cette étude, une réponse est observée à partir de 77,1 μ M à 72h de traitement avec le cyprodinil seul. Pour le fludioxonil, une réponse est observée à 24h, à partir de 18,8 μ M et l'iprodione montre une réponse à 132 μ M au bout de 72h de traitement. Ces données confirment qu'aux concentrations testées dans notre étude (< 20 μ M) et qu'à la durée de traitement choisie (24h), l'iprodione seul ne peut induire de dommage à l'ADN. Le test Cellumen phospho-H2AX est comparable à celui de l'ICW, puisque tous les deux quantifient la phosphorylation de γ -H2AX dans les cellules. Le fait d'utiliser plus de cellules dans le test ICW et d'observer la phosphorylation globale d'H2AX dans chaque puits, nous permet d'être plus sensible que le test Cellumen phospho-H2AX qui détecte chaque foci d'H2AX dans chaque cellule. En effet, des cassures double brin sont observées à 24h au lieu de 72h pour le cyprodinil, et les concentrations du fludioxonil où apparaissent les cassures sont plus faibles (18,8 μ M avec le test Cellumen phospho-H2AX / 4 μ M avec l'ICW).

Il a été également montré un effet génotoxique à faibles concentrations de ce mélange en proportions équimolaires et en proportions issues des données d'exposition, par rapport aux substances prises individuellement. Dans le cas du mélange 4, à 3 et à 10 μ M en proportions équimolaires, l'effet du mélange observé ne peut être additif, puisque les cinq substances testées séparément n'induisent pas de CDB d'ADN à 0,6 μ M et 2 μ M. Il a alors été émis l'hypothèse que l'effet du cyprodinil associé à celui du fludioxonil augmenterait les dommages à l'ADN. Cette hypothèse doit être confirmée, car dans notre étude rien n'indique que les trois autres substances n'interagissent pas avec le fludioxonil et le cyprodinil. En effet, les données provenant de la base de données ToxCast confirment qu'à très fortes concentrations l'iprodione induit également des dommages à l'ADN et peut ainsi interagir dans le mélange.

Dans cette même base de données (ToxCast), une étude sur des hépatocytes a montré que le cyprodinil à 10 μM modifiait l'expression d'enzymes de phase I (CYP2B6) et de phase II (SULT2A1 et UGT1A1) après 24h de traitement, et du CYP1A2 après 48h de traitement (Wetmore et al. 2011). À faibles concentrations et toujours sur des hépatocytes, le fludioxonil ainsi que l'iprodione, modifient également l'expression d'enzymes du métabolisme à des temps inférieurs à 24h (CYP1A2, CYP2B6, SULT2A1 et UGT1A1). Aucune donnée concernant les deux autres substances présentes dans le mélange n'est pour l'instant disponible dans cette base de données. D'après ces connaissances, il est supposé qu'une synergie d'action ait lieu entre au moins trois substances. Une modification de l'expression des enzymes du métabolisme induite par le cyprodinil et/ou l'iprodione et/ou le fludioxonil à faibles concentrations, serait alors à l'origine de la bio-transformation d'un ou plusieurs composés du mélange en métabolites plus réactifs.

Le rapport de l'OMS indique qu'après administration orale de fludioxonil radiomarqué à des chèvres, de la radioactivité est retrouvée dans le foie sous forme de résidus liés, ce qui conforte l'hypothèse d'une bioactivation métabolique de ce composé, et suggère la formation d'adduits aux macromolécules (FAO/WHO 2004). Pour confirmer l'hypothèse que des métabolites seraient capables de former des adduits à l'ADN, une mesure qualitative des adduits du mélange et du fludioxonil a été récemment réalisée au laboratoire. Les cellules HepG2 ont été traitées de la même façon que pour le test γ -H2AX. Après 24h de traitement, l'ADN des cellules (Ravanat et al. 2002) a été analysé par chromatographie liquide-spectrométrie de masse (LC-MS). Aucun adduit stable de l'ADN n'a été observé par cette méthode. Néanmoins cette méthode ne permet pas de détecter les adduits dépurinants. H2AX est une méthode très sensible car des foci de γ -H2AX sont automatiquement induits dès la première CDB d'ADN et leur présence est facilement détectable par fluorescence. Deux hypothèses peuvent alors expliquer ce résultat négatif : (i) soit des adduits dépurinants sont responsables des CDB d'ADN, mais ceux-ci ne peuvent être détectés par la méthode, (ii) soit il s'agit effectivement d'adduits stables, mais la sensibilité de la méthode LC-MS est insuffisante pour les détecter.

Le cyprodinil est un fongicide autorisé pour de nombreuses cultures (arbres fruitiers, céréales, légumes...) contre les champignons de la classe des *Ascomycètes*, *Basidiomycètes* et *Deuteromycètes* (EFSA 2005a). Il s'agit d'un inhibiteur de la synthèse protéique. En France, 12 préparations commerciales contiennent du cyprodinil, dont 8 contiennent également du fludioxonil (base de données e-phy). Comme le cyprodinil, le fludioxonil est un fongicide autorisé sur de nombreuses cultures contre *Ascomycètes*, *Basidiomycètes* et *Fungi imperfecti*. Il agit en inhibant les mitogen-activated protein (MAP) kinases intervenant dans la synthèse du glycérol. En France, 30 préparations commerciales autorisées contiennent du fludioxonil. L'évaluation du risque repose sur

des valeurs toxicologiques de références, établies à partir d'études *in vivo* sur animaux. Il est alors difficile à partir de notre étude *in vitro*, de pouvoir conclure sur l'évaluation du risque de ces composés. Néanmoins, en considérant que les modèles utilisés sont représentatifs de chacun des tissus dont ils sont issus et en estimant la dose interne correspondant à ces pesticides, il est possible d'entreprendre à partir de nos résultats une démarche d'évaluation du risque.

La DJA (Dose Journalière Admissible) du cyprodinil a été fixée à 0,03 mg/kg pc/jour (EFSA 2005a) et celle du fludioxonil à 0,37 mg/kg pc/jour (EFSA 2007). Dans notre étude, les valeurs moyennes d'exposition estimées de la population française sont d'environ 0,32 µg/kg pc/jour pour le cyprodinil et de 0,36 µg/kg pc/jour pour le fludioxonil, ce qui est 100 fois plus faible que la DJA pour le cyprodinil, et 1000 fois plus faible pour le fludioxonil. D'après ces résultats, ces molécules prises séparément ne présentent pas de risque pour la santé. Les valeurs d'exposition maximales obtenues pour chaque composé sont quant à elles de 3,19 µg/kg pc/jour pour le cyprodinil et de 4,83 µg/kg pc/jour pour le fludioxonil. En évaluation des risques, l'identification du danger par les tests *in vitro* sans considérer la biodisponibilité et la clairance peut sur- ou sous-estimer le risque potentiel de ces produits chimiques. Basé sur une étude récente, des doses orales équivalentes humaines ont été déterminées, ainsi que des doses internes théoriques, à partir d'extrapolation de données expérimentales *in vivo/in vitro* et en tenant compte du métabolisme et de la clairance des composés (Wetmore et al. 2011). À partir de ces données, nous avons calculé la dose interne équivalente du fludioxonil et du cyprodinil aux concentrations les plus faibles induisant des CDB (4 et 20 µM) sur les cellules HepG2. Ainsi, les concentrations du fludioxonil et du cyprodinil représentent une dose équivalente orale respectivement de 1,54 et 0,039 mg/kg pc/jour. Comparées aux données d'exposition humaines (obtenue par le modèle statistique de l'ANSES) pour le fludioxonil (0,36 µg/kg pc/jour) et le cyprodinil (0,32 µg/kg pc/jour), les concentrations testées sur la lignée cellulaire HepG2 sont environ 100 fois plus élevées pour le cyprodinil et 4000 fois plus élevées pour le fludioxonil que la dose interne théorique de la population générale. Si l'on compare la dose équivalente orale du fludioxonil avec la DJA, cette dernière est d'environ 4 fois supérieure. Le fludioxonil ne présente pas à lui seul un risque pour le consommateur même si les marges de sécurité restent faibles. En revanche, la dose équivalente orale obtenue avec le fludioxonil en présence de cyprodinil est proche de la DJA, ce qui pourrait présenter un risque chronique pour la santé du consommateur. Par ailleurs, nous avons fait l'hypothèse que ces deux substances provoquent de façon synergique des dommages sur l'ADN, or plus de 50 % des préparations commerciales autorisées en France contenant du cyprodinil contiennent également en association du fludioxonil. Il y a alors une forte probabilité qu'elles se retrouvent de façon chronique en association dans l'alimentation.

Les modèles d'étude pour évaluer le risque des effets combinés ne sont pas adaptés au cas du cyprodinil et du fludioxonil, puisqu'ils ont des modes d'actions ainsi que des structures chimiques

différentes rendant d'éventuels facteurs d'équivalence inopérants. Dans le cadre d'une évaluation classique du risque, ces substances seules (sans tenir compte de la dose équivalente orale du fludioxonil et du cyprodinil) ne représenteraient pas de risque pour la santé du consommateur. Or, il n'existe pas de VTR applicable pour les substances en mélanges, ce qui ne nous permet pas de conclure quant à leur risque pour le consommateur. L'homologation des préparations commerciales se fait à partir des dossiers d'AMM des substances seules, mais également à partir de données concernant la préparation (DL50 par voie orale et cutanée, CL50 par inhalation, irritation cutanée et oculaire et sensibilisation). De plus, pour évaluer le risque de ces préparations, les VTR prises en compte sont les NEAO (Niveau d'Exposition Acceptable pour l'Opérateur) ou AOEL en anglais (Acceptable Operator Exposure Level), la DJA et l'ARfD de chaque substance active seule. Il n'existe pas de VTR spécifiques aux préparations commerciales.

L'effet synergique possible entre le fludioxonil et le cyprodinil, montre l'intérêt de tester en premier lieu toutes les associations de substances actives dans les préparations commerciales aux proportions utilisées, afin de vérifier d'une part s'il n'y a pas d'effet combiné et d'autre part, de déterminer des VTR spécifiques aux préparations qui seront peut être plus faibles. Dans le cadre du nouveau règlement européen 1107/2009 concernant l'homologation des substances actives, il est demandé de s'intéresser aux potentiels effets combinés des substances actives. À partir des résultats obtenus en mélange équimolaire, la dose pour laquelle il n'est pas observé de cassures double brin d'ADN est 1 μM , ce qui correspond à une concentration de 0,2 μM pour chaque substance du mélange. Les doses internes équivalentes pour le cyprodinil et le fludioxonil à 0,2 μM sont alors respectivement de 0,39 $\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{jour}$ et de 0,077 $\text{mg}/\text{kg pc}/\text{jour}$. Un facteur de sécurité de 10 peut être appliqué pour tenir compte de la variabilité intra-cellules humaines et donc intra-individus. Nos calculs conduiraient à des valeurs seuils de 0,039 $\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{jour}$ et de 7,7 $\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{jour}$, ce qui serait environ 50 fois plus faible pour le fludioxonil et 800 fois plus faible pour le cyprodinil que les DJA actuelles. Néanmoins, ce calcul comporte des limites : il est établi à partir d'extrapolations de données *in vitro/in vivo* en considérant que les modèles utilisés sont représentatifs de chacun des tissus dont ils sont issus. Ceci ne tient donc pas compte de l'organisme en entier, et n'a par conséquent aucune valeur réglementaire.

L'exemple du mélange 4 montre la complexité des interactions possible entre les molécules en mélange. Il est alors difficile de pouvoir prédire les effets obtenus lors de l'évaluation du risque. D'autres études devront être menées pour mieux caractériser cet effet à faibles doses, en testant d'avantages de concentrations sur la lignée cellulaire HepG2. Il est également possible d'étudier des mélanges binaires entre les substances, notamment entre le cyprodinil et le fludioxonil afin de confirmer notre hypothèse d'une synergie d'action entre ces deux composés.

Dans cette étude, seuls les pesticides en mélanges ont été étudiés. Or, l'homme est également exposé à d'autres contaminants alimentaires génotoxiques (HAP, mycotoxines...) (ANSES 2011a; Audebert et al. 2010; Tarantini et al. 2011; Yang et al. 2011b), qui sont également susceptibles d'interagir avec ces mélanges (antagonisme, potentialisation....). Le modèle statistique développé à l'ANSES peut être applicable à n'importe quel contaminant alimentaire. C'est pourquoi, à partir de données de contamination, d'autres études pourront être menées afin de déterminer la co-exposition de la population française aux autres contaminants alimentaires et ainsi analyser le potentiel génotoxique de ces contaminants retrouvés en mélange.

Par ailleurs, il est difficile à partir d'étude *in vitro* de déterminer quels seront les effets sur l'homme, car la matrice alimentaire est constituée d'éléments complexes. En effet, bien qu'ils puissent contenir des traces de pesticides, les fruits et légumes contiennent également des micronutriments ayant des effets nutritionnels positifs pour la santé. Les effets protecteurs de ces derniers, tels que les flavonoïdes ou antioxydants, peuvent diminuer l'effet génotoxique des contaminants alimentaires en piégeant les ERO formés par les pesticides (Delgado et al. 2008; Edenharder et al. 2002; Franke et al. 2005; Jiang et al. 2007; Platt et al. 2010; Tapryal et al. 2010; Yang et al. 2011b). De plus, de nombreux composés présents dans l'alimentation peuvent interférer avec le métabolisme des xénobiotiques. En effet, certains aliments contiennent des substances pouvant diminuer l'activité métabolique de certains cytochromes, tel que le CYP1A2, ou au contraire l'augmenter (β -naphthoflavone) et rendre ainsi les xénobiotiques plus actifs (Hodek et al. 2011). Ainsi, il existe un grand nombre de substances inhibitrices ou inductrices des enzymes du métabolisme, pouvant interagir sur la bioactivation des pesticides. Une analyse risque/bénéfice pourra alors être envisagée en tenant compte de l'exposition de la population française aux mélanges de pesticides dans les principaux aliments contributeurs ainsi que leurs apports en nutriments bénéfiques.

Cette étude concerne uniquement la population générale, or d'autres populations plus spécifiques, telles que les végétariens ou les enfants en bas-âge, sont plus exposés que celle-ci aux pesticides. Il pourra alors être envisagé, à partir du modèle statistique, de caractériser la co-exposition de ces populations plus spécifiques afin d'analyser le potentiel génotoxique de nouveaux mélanges.

Bibliographie

- Afssa. 2009. Rapport de l'étude Individuelle Nationale des Consommations Alimentaires 2 (INCA2) 2006/2007. Rapports bleus de l'Afssa:199.
- Agopian J, Navarro JM, Gac AC, Lecluse Y, Briand M, Grenot P, Gauduchon P, Ruminy P, Lebailly P, Nadel B and others. 2009. Agricultural pesticide exposure and the molecular connection to lymphomagenesis. *J Exp Med* 206(7):1473-83.
- Alavanja MC, Dosemeci M, Samanic C, Lubin J, Lynch CF, Knott C, Barker J, Hoppin JA, Sandler DP, Coble J and others. 2004. Pesticides and lung cancer risk in the agricultural health study cohort. *Am J Epidemiol* 160(9):876-85.
- Albertini RJ, Anderson D, Douglas GR, Hagmar L, Hemminki K, Merlo F, Natarajan AT, Norppa H, Shuker DE, Tice R and others. 2000. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. International Programme on Chemical Safety. *Mutat Res* 463(2):111-72.
- Ames BN, Durston WE, Yamasaki E, Lee FD. 1973. Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70(8):2281-5.
- ANSES. 2011a. Étude de l'alimentation totale française 2 (EAT 2). Tome 2. Résidus de pesticides, additifs, acrylamide, hydrocarbures aromatiques polycycliques. Edition scientifique.
- ANSES. 2011b. Réseau national de vigilance et de prévention des pathologies professionnelles.
- Araten DJ, Nafa K, Pakdeesuwan K, Luzzatto L. 1999. Clonal populations of hematopoietic cells with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria genotype and phenotype are present in normal individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(9):5209-14.
- Ashby J, Lefevre PA, Burlinson B, Penman MG. 1985. An assessment of the in vivo rat hepatocyte DNA-repair assay. *Mutat Res* 156(1-2):1-18.
- Atherton KM, Williams FM, Egea Gonzalez FJ, Glass R, Rushton S, Blain PG, Mutch E. 2009. DNA damage in horticultural farmers: a pilot study showing an association with organophosphate pesticide exposure. *Biomarkers* 14(7):443-51.
- Attia SM. 2011. Molecular cytogenetic evaluation of the aneuploidic effects of teniposide in somatic and germinal cells of male mice. *Mutagenesis*.
- Audebert M, Dolo L, Perdu E, Cravedi JP, Zalko D. 2011. Use of the gammaH2AX assay for assessing the genotoxicity of bisphenol A and bisphenol F in human cell lines. *Arch Toxicol*.
- Audebert M, Riu A, Jacques C, Hillenweck A, Jamin EL, Zalko D, Cravedi JP. 2010. Use of the gammaH2AX assay for assessing the genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in human cell lines. *Toxicol Lett* 199(2):182-92.
- Baldi I, Gruber A, Rondeau V, Lebailly P, Brochard P, Fabrigoule C. 2011. Neurobehavioral effects of long-term exposure to pesticides: results from the 4-year follow-up of the PHYTONER study. *Occup Environ Med* 68(2):108-15.
- Baldi I, Lebailly P. 2007. Cancers and pesticides. *Rev Prat* 57(11 Suppl):40-4.
- Baldi I, Lebailly P, Mohammed-Brahim B, Letenneur L, Dartigues J-Fo, Brochard P. 2003. Neurodegenerative Diseases and Exposure to Pesticides in the Elderly. *American Journal of Epidemiology* 157(5):409-14.
- Barnes L, Dumas M, Juan M, Noblesse E, Tesniere A, Schnebert S, Guillot B, Moles JP. 2010. GammaH2AX, an accurate marker that analyzes UV genotoxic effects on human keratinocytes and on human skin. *Photochem Photobiol* 86(4):933-41.
- Baron JM, Holler D, Schiffer R, Frankenberg S, Neis M, Merk HF, Jugert FK. 2001. Expression of multiple cytochrome p450 enzymes and multidrug resistance-associated transport proteins in human skin keratinocytes. *J Invest Dermatol* 116(4):541-8.
- Bartkova J, Horejsi Z, Koed K, Kramer A, Tort F, Zieger K, Guldberg P, Sehested M, Nesland JM, Lukas C and others. 2005. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* 434(7035):864-70.
- Bassing CH, Suh H, Ferguson DO, Chua KF, Manis J, Eckersdorff M, Gleason M, Bronson R, Lee C, Alt FW. 2003. Histone H2AX: a dosage-dependent suppressor of oncogenic translocations and tumors. *Cell* 114(3):359-70.

- Basu AK, Loechler EL, Leadon SA, Essigmann JM. 1989. Genetic effects of thymine glycol: site-specific mutagenesis and molecular modeling studies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(20):7677-81.
- Boehme K, Dietz Y, Hewitt P, Mueller SO. 2010. Activation of P53 in HepG2 cells as surrogate to detect mutagens and promutagens in vitro. *Toxicol Lett* 198(2):272-81.
- Bolognesi C. 2003. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutat Res* 543(3):251-72.
- Bolognesi C, Creus A, Ostrosky-Wegman P, Marcos R. 2011. Micronuclei and pesticide exposure. *Mutagenesis* 26(1):19-26.
- Bonner WM, Redon CE, Dickey JS, Nakamura AJ, Sedelnikova OA, Solier S, Pommier Y. 2008. GammaH2AX and cancer. *Nat Rev Cancer* 8(12):957-67.
- Boon PE, Van der Voet H, Van Raaij MT, Van Klaveren JD. 2008. Cumulative risk assessment of the exposure to organophosphorus and carbamate insecticides in the Dutch diet. *Food Chem Toxicol* 46(9):3090-8.
- Boschetti C, Fermo E, Bianchi P, Vercellati C, Barraco F, Zanella A. 2004. Clinical and molecular aspects of 23 patients affected by paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Am J Hematol* 77(1):36-44.
- Bouvier G, Blanchard O, Momas I, Seta N. 2006. Pesticide exposure of non-occupationally exposed subjects compared to some occupational exposure: A French pilot study. *Science of The Total Environment* 366(1):74-91.
- Boyd CA, Weiler MH, Porter WP. 1990. Behavioral and neurochemical changes associated with chronic exposure to low-level concentration of pesticide mixtures. *J Toxicol Environ Health* 30(3):209-21.
- Branzei D, Foiani M. 2008. Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(4):297-308.
- Caldas ED, Boon PE, Tressou J. 2006a. Probabilistic assessment of the cumulative acute exposure to organophosphorus and carbamate insecticides in the Brazilian diet. *Toxicology* 222(1-2):132-42.
- Caldas ED, Tressou J, Boon PE. 2006b. Dietary exposure of Brazilian consumers to dithiocarbamate pesticides a probabilistic approach. *Food Chem Toxicol* 44(9):1562-71.
- Caldecott KW. 2008. Single-strand break repair and genetic disease. *Nat Rev Genet* 9(8):619-31.
- Canistro D, Pozzetti L, Sapone A, Broccoli M, Affatato AA, Stradiotti A, Longo V, Menichini P, Barale R, Paolini M. 2008. Perturbation of murine liver cyp-superfamily of isoforms by different combinations of pesticide mixtures. *Food and Chemical Toxicology* 46(1):34-42.
- Canturk P, Caner V, Oruc N, Akarca US, Tepeli E, Cetin OG, Zencir S, Topcu Z. 2010. The mRNA expression of cytochrome P450 isoforms in human gastric tissue. *Hepatogastroenterology* 57(98):372-6.
- CCA. 2011. Commission du Codex Alimentarius. Manuel de procédure, 20ème édition. http://www.codexalimentarius.net/web/index_fr.jsp
- Celeste A, Fernandez-Capetillo O, Kruhlak MJ, Pilch DR, Staudt DW, Lee A, Bonner RF, Bonner WM, Nussenzweig A. 2003. Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nat Cell Biol* 5(7):675-9.
- Celeste A, Petersen S, Romanienko PJ, Fernandez-Capetillo O, Chen HT, Sedelnikova OA, Reina-San-Martin B, Coppola V, Meffre E, Difilippantonio MJ and others. 2002. Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science* 296(5569):922-7.
- Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ. 2003. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem* 278(38):36027-31.
- CLH. 2011. Report for tebufenpyrad, http://echa.europa.eu/doc/consultations/cl/clh_tebufenpyrad.pdf
- Collins A. 2004. The comet assay for DNA damage and repair. *Molecular Biotechnology* 26(3):249-61.
- Court MH, Zhang X, Ding X, Yee KK, Hesse LM, Finel M. 2011. Quantitative distribution of mRNAs encoding the 19 human UDP-glucuronosyltransferase enzymes in 26 adult and 3 fetal tissues. *Xenobiotica*.

- Crépet A, Tressou J. 2011. Bayesian nonparametric model for clustering individual co-exposure to pesticides found in the French diet. *bayesian analysis* 6(1):127-44.
- Crépet A., Tressou J., Graillot V., Béchaux C., Pierlot S., F. H, J.Ch. L. submitted. Identification of the main pesticide residue cocktails to which the French population is exposed: a Bayesian approach. *Environmental Research*.
- Damalas CA, Eleftherohorinos IG. 2011. Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators. *Int J Environ Res Public Health* 8(5):1402-19.
- Das PP, Shaik AP, Jamil K. 2007. Genotoxicity induced by pesticide mixtures: in-vitro studies on human peripheral blood lymphocytes. *Toxicol Ind Health* 23(8):449-58.
- De Flora S, Izzotti A. 2007. Mutagenesis and cardiovascular diseases: Molecular mechanisms, risk factors, and protective factors. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 621(1-2):5-17.
- de Kok TM, Moonen HJ, van Delft J, van Schooten FJ. 2002. Methodologies for bulky DNA adduct analysis and biomonitoring of environmental and occupational exposures. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 778(1-2):345-55.
- Decker M, Arand M, Cronin A. 2009. Mammalian epoxide hydrolases in xenobiotic metabolism and signalling. *Arch Toxicol* 83(4):297-318.
- Delgado ME, Haza AI, Arranz N, Garcia A, Morales P. 2008. Dietary polyphenols protect against N-nitrosamines and benzo(a)pyrene-induced DNA damage (strand breaks and oxidized purines/pyrimidines) in HepG2 human hepatoma cells. *Eur J Nutr* 47(8):479-90.
- Delhomme O, Raeppe C, Briand O, Millet M. 2011. Analytical method for assessing potential dermal exposure to pesticides of a non-agricultural occupationally exposed population. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 399(3):1325-34.
- Demsia G, Vlastos D, Goumenou M, Matthopoulos DP. 2007. Assessment of the genotoxicity of imidacloprid and metalaxyl in cultured human lymphocytes and rat bone-marrow. *Mutat Res* 634(1-2):32-9.
- Dertinger SD, Phonethepswath S, Weller P, Nicolette J, Murray J, Sonders P, Vohr HW, Shi J, Krsmanovic L, Gleason C and others. 2011. International Pig-a gene mutation assay trial: Evaluation of transferability across 14 laboratories. *Environ Mol Mutagen*.
- DGCCRF. 2008. Enquêtes 2006 sur les résidus de pesticides dans les fruits et légumes. http://www.minefe.gouv.fr/directions_services/dgccrf/actualites/breves/2008/brv0408b.htm.
- Dipple A. 1995. DNA adducts of chemical carcinogens. *Carcinogenesis* 16(3):437-41.
- Directive75/440/CEE. 1975. Directive n° 75/440/CEE du 16/06/75 concernant la qualité requise des eaux superficielles destinées à la production d'eau alimentaire dans les Etats membres.
- Directive91/414/EEC. 1991. Directive 91/414/EEC du Conseil du 15 juillet 1991 concernant la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques.
- Directive98/8/CE. 1998. Directive 98/8/CE du Parlement européen et du Conseil du 16 février 1998 concernant la mise sur le marché des produits biocides.
- Directive98/83/CE. 1998. Directive 98/83/CE du conseil du 3 novembre 1998 relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine.
- Dobrovolsky VN, Elespuru RK, Bigger CA, Robison TW, Heflich RH. 2011. Monitoring humans for somatic mutation in the endogenous pig-a gene using red blood cells. *Environ Mol Mutagen*.
- Dobrovolsky VN, Shaddock JG, Mittelstaedt RA, Manjanatha MG, Miura D, Uchikawa M, Mattison DR, Morris SM. 2009. Evaluation of *Macaca mulatta* as a model for genotoxicity studies. *Mutat Res* 673(1):21-8.
- Dubuisson C, Lioret S, Touvier M, Dufour A, Calamassi-Tran G, Volatier JL, Lafay L. 2010. Trends in food and nutritional intakes of French adults from 1999 to 2007: results from the INCA surveys. *Br J Nutr* 103(7):1035-48.
- Dumont C, Perdu E, de Sousa G, Debrauwer L, Rahmani R, Cravedi JP, Chagnon MC. 2011. Bis(hydroxyphenyl)methane-bisphenol F-metabolism by the HepG2 human hepatoma cell line and cryopreserved human hepatocytes. *Drug Chem Toxicol* 34(4):445-53.

- Eastmond DA, Hartwig A, Anderson D, Anwar WA, Cimino MC, Dobrev I, Douglas GR, Nohmi T, Phillips DH, Vickers C. 2009. Mutagenicity testing for chemical risk assessment: update of the WHO/IPCS Harmonized Scheme. *Mutagenesis* 24(4):341-9.
- Edenharder R, Sager JW, Glatt H, Muckel E, Platt KL. 2002. Protection by beverages, fruits, vegetables, herbs, and flavonoids against genotoxicity of 2-acetylaminofluorene and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in metabolically competent V79 cells. *Mutat Res* 521(1-2):57-72.
- EFSA. 2005a. Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance cyprodinil. *EFSA Scientific Report* 51:1-78.
- EFSA. 2005b. Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA related to a harmonised approach for risk assessment of substances which are both genotoxic and carcinogenic. *EFSA Journal*.
- EFSA. 2006. Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance fipronil. *Scientific Report*(65):1-110.
- EFSA. 2007. Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance fludioxonil. *Scientific Report* 110:1-85.
- EFSA. 2008a. Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance fenpyroximate. *Scientific Report* 197:1-104.
- EFSA. 2008b. Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance tebufenpyrad. *Scientific Report* 192:1-100.
- EFSA. 2008c. Monitoring of pesticide residues in products of plant origin in the European Union, Norway, Iceland and Liechtenstein. Brussels.
- EFSA. 2008d. Opinion of the Scientific Panel on Plant Protection products and their Residues to evaluate the suitability of existing methodologies and, if appropriate, the identification of new approaches to assess cumulative and synergistic risks from pesticides to human health with a view to set MRLs for those pesticides in the frame of Regulation (EC) 396/2005. *The EFSA Journal* 704:1-84.
- EFSA. 2010a. Annual Report on Pesticide Residues according to Article 32 of Regulation (EC) n° 396/2005.
- EFSA. 2010b. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance imazalil. *EFSA Journal* 8(3):1526.
- EFSA. 2010c. Consumer safety assessment of the EU MRLs established for methidathion. *EFSA Journal* 8(6):1639
- EFSA. 2011a. The 2009 European Union Report on Pesticide Residues in Food. *EFSA Journal*.
- EFSA. 2011b. Scientific Committee. Draft Scientific Opinion on Genotoxicity Testing Strategies applicable in food and feed safety assessment. European Food Safety Authority. Available online: www.efsa.europa.eu.
- EFSA. 2011c. Scientific Committee; Draft Scientific Opinion on Genotoxicity Testing Strategies applicable in food and feed safety assessment. European Food Safety Authority. Available online: www.efsa.europa.eu.
- Egeghy PP, Cohen Hubal EA, Tulse NS, Melnyk LJ, Morgan MK, Fortmann RC, Sheldon LS. 2011. Review of pesticide urinary biomarker measurements from selected US EPA children's observational exposure studies. *Int J Environ Res Public Health* 8(5):1727-54.
- Elespuru RK, Sankaranarayanan K. 2007. New approaches to assessing the effects of mutagenic agents on the integrity of the human genome. *Mutat Res* 616(1-2):83-9.
- Erickson RP. 2010. Somatic gene mutation and human disease other than cancer: an update. *Mutat Res* 705(2):96-106.
- Euro G-F. 1995. Report on a workshop in the frame of GEMS-Food Euro, EUR/HFA target 22. Second workshop on reliable evaluation of low-level contamination of food. 26-27 May 1995. Kulmbach, Federal Republic of Germany.
- FAO/WHO. 2004. Pesticide residues in food 2004. http://www.fao.org/ag/AGP/AGPP/Pesticid/JMPR/Download/2004_eva/JMPR2004eva.pdf.

- Faucet-Marquis. 2005. L'ochratoxine A, contaminant alimentaire, est-elle un cancérigène génotoxique ou épigénétique ? Recherche des effets génotoxiques par la technique de post-marquage de l'ADN au 32P en relation avec la métabolisation de l'ochratoxine A.
- Feinberg M, Bertail P, Tressou J, Verger P. 2006. Analyse des risques alimentaires. 400 p.
- Fleck O, Nielsen O. 2004. DNA repair. *J Cell Sci* 117(Pt 4):515-7.
- Forbes SA, Bindal N, Bamford S, Cole C, Kok CY, Beare D, Jia M, Shepherd R, Leung K, Menzies A and others. 2011. COSMIC: mining complete cancer genomes in the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer. *Nucleic Acids Res* 39(Database issue):D945-50.
- Franke SI, Pra D, Erdtmann B, Henriques JA, da Silva J. 2005. Influence of orange juice over the genotoxicity induced by alkylating agents: an in vivo analysis. *Mutagenesis* 20(4):279-83.
- Fukuda H, Sano N, Muto S, Horikoshi M. 2006. Simple histone acetylation plays a complex role in the regulation of gene expression. *Brief Funct Genomic Proteomic* 5(3):190-208.
- Gallois J, Pottier D, Houssin M, Le Goff J, André V. 2011. DNA adduct variations in non-smoking crop farmers: Potential relationship with occupational exposure to pesticides? *Environmental Toxicology and Pharmacology* 32(1):1-9.
- Gatehouse D, Haworth S, Cebula T, Gocke E, Kier L, Matsushima T, Melcion C, Nohmi T, Ohta T, Venitt S and others. 1994. Recommendations for the performance of bacterial mutation assays. *Mutat Res* 312(3):217-33.
- Glatt H. 2000. Sulfotransferases in the bioactivation of xenobiotics. *Chem Biol Interact* 129(1-2):141-70.
- Glatt H, Engelke CE, Pabel U, Teubner W, Jones AL, Coughtrie MW, Andrae U, Falany CN, Meinel W. 2000. Sulfotransferases: genetics and role in toxicology. *Toxicol Lett* 112-113:341-8.
- Gordon CJ, Herr DW, Gennings C, Graff JE, McMurray M, Stork L, Coffey T, Hamm A, Mack CM. 2006. Thermoregulatory response to an organophosphate and carbamate insecticide mixture: testing the assumption of dose-additivity. *Toxicology* 217(1):1-13.
- Gorgoulis VG, Vassiliou LV, Karakaidos P, Zacharatos P, Kotsinas A, Liloglou T, Venere M, Dittullo RA, Jr., Kastrinakis NG, Levy B and others. 2005. Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature* 434(7035):907-13.
- Graillot V, Takakura N, Hegarat LL, Fessard V, Audebert M, Cravedi JP. 2012. Genotoxicity of pesticide mixtures present in the diet of the French population. *Environ Mol Mutagen* 53(3):173-84.
- Guéguen Y, Mouzat K, Ferrari L, Tissandie E, Lobaccaro JMA, Batt A-M, Paquet F, Voisin P, Aigueperse J, Gourmelon P and others. 2006. Les cytochromes P450 : métabolisme des xénobiotiques, régulation et rôle en clinique. *Annales de Biologie Clinique* 64 (6):535-48.
- Guillouzo A, Corlu A, Aninat C, Glaize D, Morel F, Guguen-Guillouzo C. 2007. The human hepatoma HepaRG cells: a highly differentiated model for studies of liver metabolism and toxicity of xenobiotics. *Chem Biol Interact* 168(1):66-73.
- Hagan RS, Manak MS, Buch HK, Meier MG, Meraldi P, Shah JV, Sorger PK, Doxsey SJ. 2011. p31comet acts to ensure timely spindle checkpoint silencing subsequent to kinetochore attachment. *Mol Biol Cell* 22(22):4236-46.
- Hanawalt PC. 2002. Subpathways of nucleotide excision repair and their regulation. *Oncogene* 21(58):8949-56.
- Harper JW, Elledge SJ. 2007. The DNA damage response: ten years after. *Mol Cell* 28(5):739-45.
- Hart SN, Li Y, Nakamoto K, Subileau EA, Steen D, Zhong XB. 2010. A comparison of whole genome gene expression profiles of HepaRG cells and HepG2 cells to primary human hepatocytes and human liver tissues. *Drug Metab Dispos* 38(6):988-94.
- Herberg S, Deheeger M, Preziosi P. 1994. SU-VI-MAX Portions alimentaires. Manuel photos pour l'estimation des quantités. Editions Poly Technica.
- Higgins LG, Hayes JD. 2011. Mechanisms of induction of cytosolic and microsomal glutathione transferase (GST) genes by xenobiotics and pro-inflammatory agents. *Drug Metab Rev* 43(2):92-137.
- Hodek P, Krizkova J, Frei E, Singh R, Arlt VM, Stiborova M. 2011. Impact of beta-naphthoflavone on genotoxicity of food-derived carcinogens. *Neuro Endocrinol Lett* 32 Suppl 1:25-34.

- Hoeijmakers JH. 2009. DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med* 361(15):1475-85.
- Hsiao PW, Chang CC, Liu HF, Tsai CM, Chiu TH, Chao JI. 2007. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase by celecoxib oppositely regulates survivin and gamma-H2AX in human colorectal cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 222(1):97-104.
- Hu R, Mukhina GL, Piantadosi S, Barber JP, Jones RJ, Brodsky RA. 2005. PIG-A mutations in normal hematopoiesis. *Blood* 105(10):3848-54.
- Huang R, Southall N, Cho MH, Xia M, Inglese J, Austin CP. 2008. Characterization of diversity in toxicity mechanism using in vitro cytotoxicity assays in quantitative high throughput screening. *Chem Res Toxicol* 21(3):659-67.
- Huang X, Kurose A, Tanaka T, Traganos F, Dai W, Darzynkiewicz Z. 2006a. Sequential phosphorylation of Ser-10 on histone H3 and ser-139 on histone H2AX and ATM activation during premature chromosome condensation: relationship to cell-cycle phase and apoptosis. *Cytometry A* 69(4):222-9.
- Huang X, Tanaka T, Kurose A, Traganos F, Darzynkiewicz Z. 2006b. Constitutive histone H2AX phosphorylation on Ser-139 in cells untreated by genotoxic agents is cell-cycle phase specific and attenuated by scavenging reactive oxygen species. *Int J Oncol* 29(2):495-501.
- Huang Y, Hou H, Yi Q, Zhang Y, Chen D, Jiang E, Xia Y, Fenech M, Shi Q. 2011. The fate of micronucleated cells post X-irradiation detected by live cell imaging. *DNA Repair* 10(6):629-638.
- Iarmarcovai G, Botta A, Orsiere T. 2007. [Changes in chromosome number, genetic instability, and occupational exposures]. *Bull Cancer* 94(4):381-8.
- Ide T, Tsutsui H, Kinugawa S, Utsumi H, Kang D, Hattori N, Uchida K, Arimura K, Egashira K, Takeshita A. 1999. Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium. *Circ Res* 85(4):357-63.
- IPCS. 2009. Principles for Risk Assessment of Chemicals in Food.
- Isidori M, Caterino E, Criscuolo E, Fatigati V, Liguori G, Parrella A. 2009. Antimutagenic and antigenotoxic effects of vegetable matrices on the activity of pesticides. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 26(7):1049-62.
- Ismail IH, Wadhwa TI, Hammarsten O. 2007. An optimized method for detecting gamma-H2AX in blood cells reveals a significant interindividual variation in the gamma-H2AX response among humans. *Nucleic Acids Res* 35(5):e36.
- Iwanari M, Nakajima M, Kizu R, Hayakawa K, Yokoi T. 2002. Induction of CYP1A1, CYP1A2, and CYP1B1 mRNAs by nitropolycyclic aromatic hydrocarbons in various human tissue-derived cells: chemical-, cytochrome P450 isoform-, and cell-specific differences. *Arch Toxicol* 76(5-6):287-98.
- Jackson SP, Bartek J. 2009. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461(7267):1071-8.
- Jacobsen PR, Christiansen S, Boberg J, Nellemann C, Hass U. 2009. Combined exposure to endocrine disrupting pesticides impairs parturition, causes pup mortality and affects sexual differentiation in rats. *Int J Androl* 33(2):434-42.
- Janssen A, van der Burg M, Szuhai K, Kops GJ, Medema RH. 2011. Chromosome segregation errors as a cause of DNA damage and structural chromosome aberrations. *Science* 333(6051):1895-8.
- Japan FSCo. 2004. Evaluation report of TOLFENPYRAD. http://www.fsc.go.jp/english/evaluationreports/pesticide/evaluationreport_tolfenpyrad.pdf.
- Jensen AF, Petersen A, Granby K. 2003. Cumulative risk assessment of the intake of organophosphorus and carbamate pesticides in the Danish diet. *Food Addit Contam* 20(8):776-85.
- Jiang L, Cao J, An Y, Geng C, Qu S, Zhong L. 2007. Genotoxicity of acrylamide in human hepatoma G2 (HepG2) cells. *Toxicol In Vitro* 21(8):1486-92.
- Kastan MB, Bartek J. 2004. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 432(7015):316-23.
- Kaushik G, Satya S, Naik SN. 2009. Food processing a tool to pesticide residue dissipation - A review. *Food Research International* 42(1):26-40.

- Khanna KK, Jackson SP. 2001. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet* 27(3):247-54.
- Kim YJ, Lee SH, Lee SW, Ahn YJ. 2004. Fenpyroximate resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae): cross-resistance and biochemical resistance mechanisms. *Pest Manag Sci* 60(10):1001-6.
- Kimoto T, Suzuki K, Kobayashi XM, Dobrovolsky VN, Heflich RH, Miura D, Kasahara Y. 2011. Manifestation of Pig-a mutant bone marrow erythroids and peripheral blood erythrocytes in mice treated with N-ethyl-N-nitrosourea: direct sequencing of Pig-a cDNA from bone marrow cells negative for GPI-anchored protein expression. *Mutat Res* 723(1):36-42.
- Kirkland D, Aardema M, Henderson L, Müller L. 2005. Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens: I. Sensitivity, specificity and relative predictivity. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 584(1-2):1-256.
- Kirkland D, Kasper P, Muller L, Corvi R, Speit G. 2008. Recommended lists of genotoxic and non-genotoxic chemicals for assessment of the performance of new or improved genotoxicity tests: a follow-up to an ECVAM workshop. *Mutat Res* 653(1-2):99-108.
- Kirkland D, Pfuhler S, Tweats D, Aardema M, Corvi R, Darroudi F, Elhajouji A, Glatt H, Hastwell P, Hayashi M and others. 2007. How to reduce false positive results when undertaking in vitro genotoxicity testing and thus avoid unnecessary follow-up animal tests: Report of an ECVAM Workshop. *Mutat Res* 628(1):31-55.
- Klaunig JE, Wang Z, Pu X, Zhou S. 2011. Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis. *Toxicology and Applied Pharmacology* 254(2):86-99.
- Knasmuller S, Parzefall W, Sanyal R, Ecker S, Schwab C, Uhl M, Mersch-Sundermann V, Williamson G, Hietsch G, Langer T and others. 1998. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. *Mutat Res* 402(1-2):185-202.
- Knight TR, Choudhuri S, Klaassen CD. 2007. Constitutive mRNA expression of various glutathione S-transferase isoforms in different tissues of mice. *Toxicol Sci* 100(2):513-24.
- Koc H, Swenberg JA. 2002. Applications of mass spectrometry for quantitation of DNA adducts. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 778(1-2):323-43.
- Kress S, Greenlee WF. 1997. Cell-specific regulation of human CYP1A1 and CYP1B1 genes. *Cancer Res* 57(7):1264-9.
- Kufe DW, Holland JF, Frei E, American Cancer Society. 2003. *Cancer medicine* 6. Hamilton, Ont. ; Lewiston, NY distributor: BC Decker.
- Kurebayashi H, Okudaira K, Ohno Y. 2010. Species difference of metabolic clearance of bisphenol A using cryopreserved hepatocytes from rats, monkeys and humans. *Toxicology Letters* 198(2):210-5.
- Lebailly P, Vigreux C, Lechevrel C, Ledemeney D, Godard T, Sichel F, LeTalaer JY, Henry-Amar M, Gauduchon P. 1998. DNA damage in mononuclear leukocytes of farmers measured using the alkaline comet assay: modifications of DNA damage levels after a one-day field spraying period with selected pesticides. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 7(10):929-40.
- Leblanc JC, Guérin T, Verger P, Volatier JL. 2004. Etude de l'alimentation totale française. Mycotoxines, minéraux et éléments traces. 72 p.
- Leopardi P, Cordelli E, Villani P, Cremona TP, Conti L, De Luca G, Crebelli R. 2010. Assessment of in vivo genotoxicity of the rodent carcinogen furan: evaluation of DNA damage and induction of micronuclei in mouse splenocytes. *Mutagenesis* 25(1):57-62.
- Levine AJ. 1997. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88(3):323-31.
- Li Y, Chen L, Chen Z, Coehlo J, Cui L, Liu Y, Lopez T, Sankaran G, Vega H, Krieger R. 2011. Glove Accumulation of Pesticide Residues for Strawberry Harvester Exposure Assessment. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 86(6):615-20.
- Lieber MR. 2010. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu Rev Biochem* 79:181-211.

- Lieber MR, Yu K, Raghavan SC. 2006. Roles of nonhomologous DNA end joining, V(D)J recombination, and class switch recombination in chromosomal translocations. *DNA Repair (Amst)* 5(9-10):1234-1245.
- Lindsay J, Wang LL, Li Y, Zhou SF. 2008. Structure, function and polymorphism of human cytosolic sulfotransferases. *Curr Drug Metab* 9(2):99-105.
- Lioret S, Dubuisson C, Dufour A, Touvier M, Calamassi-Tran G, Maire B, Volatier JL, Lafay L. 2010. Trends in food intake in French children from 1999 to 2007: results from the INCA (etude Individuelle Nationale des Consommations Alimentaires) dietary surveys. *Br J Nutr* 103(4):585-601.
- Liska DJ. 1998. The detoxification enzyme systems. *Altern Med Rev* 3(3):187-98.
- Liu Y, Prasad R, Beard WA, Kedar PS, Hou EW, Shock DD, Wilson SH. 2007. Coordination of steps in single-nucleotide base excision repair mediated by apurinic/aprimidinic endonuclease 1 and DNA polymerase beta. *J Biol Chem* 282(18):13532-41.
- Lodovici M, Casalini C, Briani C, Dolara P. 1997. Oxidative liver DNA damage in rats treated with pesticide mixtures. *Toxicology* 117(1):55-60.
- Macurek L, Lindqvist A, Voets O, Kool J, Vos HR, Medema RH. 2010. Wip1 phosphatase is associated with chromatin and dephosphorylates γ H2AX to promote checkpoint inhibition. *Oncogene* 29(15):2281-91.
- Magnaldo T. 2004. La «guerre» du NER (nucleotide excision repair) M/S : médecine sciences 20(3):268-270.
- Mah LJ, El-Osta A, Karagiannis TC. 2010a. GammaH2AX as a molecular marker of aging and disease. *Epigenetics* 5(2):129-36.
- Mah LJ, El-Osta A, Karagiannis TC. 2010b. gammaH2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. *Leukemia* 24(4):679-86.
- Mannerström M, Toimela T, Ylikomi T, Tähti H. 2006. The combined use of human neural and liver cell lines and mouse hepatocytes improves the predictability of the neurotoxicity of selected drugs. *Toxicology Letters* 165(2):195-202.
- Mao H, Deng Z, Wang F, Harris TM, Stone MP. 1998. An intercalated and thermally stable FAPY adduct of aflatoxin B1 in a DNA duplex: structural refinement from 1H NMR. *Biochemistry* 37(13):4374-87.
- Marinovitch M, Ghilardi F, Galli CL. 1996. Effect of pesticide mixtures on in vitro nervous cells: comparison with single pesticides. *Toxicology* 108(3):201-6.
- Merhi M, Raynal H, Cahuzac E, Vinson F, Cravedi JP, Gamet-Payrastre L. 2007. Occupational exposure to pesticides and risk of hematopoietic cancers: meta-analysis of case-control studies. *Cancer Causes Control* 18(10):1209-26.
- Mitchell AD, Auletta AE, Clive D, Kirby PE, Moore MM, Myhr BC. 1997. The L5178Y/tk+/- mouse lymphoma specific gene and chromosomal mutation assay a phase III report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Res* 394(1-3):177-303.
- Miura D, Dobrovolsky VN, Kasahara Y, Katsuura Y, Heflich RH. 2008a. Development of an in vivo gene mutation assay using the endogenous Pig-A gene: I. Flow cytometric detection of CD59-negative peripheral red blood cells and CD48-negative spleen T-cells from the rat. *Environ Mol Mutagen* 49(8):614-21.
- Miura D, Dobrovolsky VN, Mittelstaedt RA, Kasahara Y, Katsuura Y, Heflich RH. 2008b. Development of an in vivo gene mutation assay using the endogenous Pig-A gene: II. Selection of Pig-A mutant rat spleen T-cells with proaerolysin and sequencing Pig-A cDNA from the mutants. *Environ Mol Mutagen* 49(8):622-30.
- Miura D, Shaddock JG, Mittelstaedt RA, Dobrovolsky VN, Kimoto T, Kasahara Y, Heflich RH. 2011. Analysis of mutations in the Pig-a gene of spleen T-cells from N-ethyl-N-nitrosourea-treated fisher 344 rats. *Environ Mol Mutagen* 52(5):419-23.
- Moisan F, Spinosi J, Dupupet JL, Delabre L, Mazurie JL, Goldberg M, Imbernon E, Tzourio C, Elbaz A. 2011. The relation between type of farming and prevalence of Parkinson's disease among agricultural workers in five French districts. *Mov Disord* 26(2):271-9.

- Mondal NK, Ghosh S, Ray MR. 2011. Micronucleus formation and DNA damage in buccal epithelial cells of Indian street boys addicted to gasp "Golden glue". *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 721(2):178-183.
- Muller L, Sofuni T. 2000. Appropriate levels of cytotoxicity for genotoxicity tests using mammalian cells in vitro. *Environ Mol Mutagen* 35(3):202-05.
- Murphy MP. 2009. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 417(1):1-13.
- Musacchio A, Salmon ED. 2007. The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(5):379-93.
- Nakada S, Chen GI, Gingras A-C, Durocher D. 2008. PP4 is a [gamma]H2AX phosphatase required for recovery from the DNA damage checkpoint. *EMBO Rep* 9(10):1019-1026.
- Nebert DW, Adesnik M, Coon M, al. E. 1987. The P450 gene superfamily : recommended nomenclature. *DNA* 6:1-11.
- Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW and others. 1996. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 6(1):1-42.
- Noel L, Leblanc JC, Guerin T. 2003. Determination of several elements in duplicate meals from catering establishments using closed vessel microwave digestion with inductively coupled plasma mass spectrometry detection: estimation of daily dietary intake. *Food Addit Contam* 20(1):44-56.
- Nougadere A, Reninger JC, Volatier JL, Leblanc JC. 2011. Chronic dietary risk characterization for pesticide residues: a ranking and scoring method integrating agricultural uses and food contamination data. *Food Chem Toxicol* 49(7):1484-510.
- Nouspikel T. 2009. DNA repair in mammalian cells : Nucleotide excision repair: variations on versatility. *Cell Mol Life Sci* 66(6):994-1009.
- O'Driscoll M, Jeggo PA. 2006. The role of double-strand break repair - insights from human genetics. *Nat Rev Genet* 7(1):45-54.
- OCDE. Essai n°425: Toxicité aiguë par voie orale: méthode de l'ajustement des doses.
- OCDE. Essai n° 452 : Etudes de toxicité chronique: OECD Publishing.
- OCDE. Essai n° 471: Essai de mutation réverse sur des bactéries: Editions OCDE.
- OCDE. Essai n° 473: Essai d'aberration chromosomique in vitro chez les mammifères: Editions OCDE.
- OCDE. Essai n° 475: Essai d'aberration chromosomique sur moelle osseuse de mammifères: Editions OCDE.
- OCDE. Essai n° 476: Essai in vitro de mutation génique sur des cellules de mammifères: Editions OCDE.
- OCDE. Essai n° 487 : Essai in vitro de micronoyaux sur cellules de mammifères: Editions OCDE.
- Ojha A, Srivastava N. 2012. Redox imbalance in rat tissues exposed with organophosphate pesticides and therapeutic potential of antioxidant vitamins. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 75(0):230-41.
- Ojha A, Yaduvanshi SK, Pant SC, Lomash V, Srivastava N. 2011. Evaluation of DNA damage and cytotoxicity induced by three commonly used organophosphate pesticides individually and in mixture, in rat tissues. *Environmental Toxicology:n/a-n/a*.
- Olive PL, Banath JP. 1993. Detection of DNA double-strand breaks through the cell cycle after exposure to X-rays, bleomycin, etoposide and 125I dUrd. *Int J Radiat Biol* 64(4):349-58.
- Olivero-Verbel J, Guerrero-Castilla A, Ramos NR. 2011. Biochemical effects induced by the hexachlorocyclohexanes. *Rev Environ Contam Toxicol* 212:1-28.
- ORP, ANSES. 2011. Exposition de la population générale aux résidus de pesticides en France. Synthèse et recommandations du comité d'orientation et de prospective scientifique de l'observatoire des résidus de pesticides (ORP).
- Orsière T, Sari-Minodier I, Decome L, Botta C, Iarmarcovai G, Botta A. 2005. De la génotoxicologie à la biosurveillance. *Journées Nationales de Santé au Travail dans le BTP. Annales* 28:25-28.
- Ostling O, Johanson KJ. 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 123(1):291-8.

- Parent R, Marion MJ, Furio L, Trepo C, Petit MA. 2004. Origin and characterization of a human bipotent liver progenitor cell line. *Gastroenterology* 126(4):1147-56.
- Peterson LA. 2010. Formation, repair, and genotoxic properties of bulky DNA adducts formed from tobacco-specific nitrosamines. *J Nucleic Acids* 2010.
- Platt KL, Edenharder R, Aderhold S, Muckel E, Glatt H. 2010. Fruits and vegetables protect against the genotoxicity of heterocyclic aromatic amines activated by human xenobiotic-metabolizing enzymes expressed in immortal mammalian cells. *Mutat Res* 703(2):90-8.
- Pons F, Haag M, Corcos L, Bonnet P, Guillouzo A, Lugnier A, Frossard N. 2000. Inhalation of toluene diisocyanate affects cytochrome P450 2B1 expression in rat lung. *Arch Toxicol* 74(7):397-403.
- Pukkala E, Martinsen JI, Lynge E, Gunnarsdottir HK, Sparen P, Tryggvadottir L, Weiderpass E, Kjaerheim K. 2009. Occupation and cancer - follow-up of 15 million people in five Nordic countries. *Acta Oncol* 48(5):646-790.
- Radak Z, Zhao Z, Goto S, Koltai E. 2011. Age-associated neurodegeneration and oxidative damage to lipids, proteins and DNA. *Molecular Aspects of Medicine* 32(4-6):305-315.
- Rass E, Grabarz A, Bertrand P, Lopez BS. 2011. Réparation des cassures double-brin de l'ADN, un mécanisme peut en cacher un autre : la ligature d'extrémités non homologues alternative. *Cancer/Radiothérapie*(0).
- Ravanat JL, Douki T, Duez P, Gremaud E, Herbert K, Hofer T, Lasserre L, Saint-Pierre C, Favier A, Cadet J. 2002. Cellular background level of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine: an isotope based method to evaluate artefactual oxidation of DNA during its extraction and subsequent work-up. *Carcinogenesis* 23(11):1911-8.
- Redon CE, Nakamura AJ, Sordet O, Dickey JS, Gouliava K, Tabb B, Lawrence S, Kinders RJ, Bonner WM, Sedelnikova OA. 2011. gamma-H2AX detection in peripheral blood lymphocytes, splenocytes, bone marrow, xenografts, and skin. *Methods Mol Biol* 682:249-70.
- Reffstrup TK, Larsen JC, Meyer O. 2010. Risk assessment of mixtures of pesticides. Current approaches and future strategies. *Regul Toxicol Pharmacol* 56(2):174-92.
- Règlement. 2005. Règlement (CE) N° 396/2005 du Parlement européen et du Conseil du 23 février 2005 concernant les limites maximales applicables aux résidus de pesticides présents dans ou sur les denrées alimentaires et les aliments pour animaux d'origine végétale et animale et modifiant la directive 91/414/CEE du Conseil.
- Règlement. 2007. Règlement (CE) N° 834/2007 du Conseil du 28 juin 2007 relatif à la production biologique et à l'étiquetage des produits biologiques et abrogeant le règlement (CEE) n° 2092/91.
- Règlement. 2008a. Règlement (CE) N° 967/2008 du Conseil du 29 septembre 2008 modifiant le règlement (CE) no 834/2007 relatif à la production biologique et à l'étiquetage des produits biologiques.
- Règlement. 2008b. Règlement (CE) N° 1272/2008 du Parlement européen et du conseil du 16 décembre 2008 relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances et des mélanges, modifiant et abrogeant les directives 67/548/CEE et 1999/45/CE et modifiant le règlement (CE) no 1907/2006.
- Règlement. 2009. Règlement (CE) N° 1107/2009 du Parlement européen et du Conseil du 21 octobre 2009 concernant la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques et abrogeant les directives 79/117/CEE et 91/414/CEE du Conseil.
- Rendu F, Peoc'h K, Berlin I, Thomas D, Launay JM. 2011. Smoking related diseases: the central role of monoamine oxidase. *Int J Environ Res Public Health* 8(1):136-47.
- Rider CV, Wilson VS, Howdeshell KL, Hotchkiss AK, Furr JR, Lambright CR, Gray LE, Jr. 2009. Cumulative effects of in utero administration of mixtures of "antiandrogens" on male rat reproductive development. *Toxicol Pathol* 37(1):100-13.
- Rodriguez-Antona C, Leskela S, Zajac M, Cuadros M, Alves J, Moneo MV, Martin C, Cigudosa JC, Carnero A, Robledo M and others. 2007. Expression of CYP3A4 as a predictor of response to chemotherapy in peripheral T-cell lymphomas. *Blood* 110(9):3345-51.

- Rogakou EP, Nieves-Neira W, Boon C, Pommier Y, Bonner WM. 2000. Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139. *J Biol Chem* 275(13):9390-5.
- Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. 1998. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 273(10):5858-68.
- Roos WP, Kaina B. 2006. DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol Med* 12(9):440-50.
- Rushmore TH, Kong AN. 2002. Pharmacogenomics, regulation and signaling pathways of phase I and II drug metabolizing enzymes. *Curr Drug Metab* 3(5):481-90.
- Sarikaya D, Bilgen C, Kamataki T, Topcu Z. 2006. Comparative cytochrome P450 -1A1, -2A6, -2B6, -2C, -2D6, -2E1, -3A5 and -4B1 expressions in human larynx tissue analysed at mRNA level. *Biopharm Drug Dispos* 27(8):353-9.
- Scarpato R, Verola C, Fabiani B, Bianchi V, Saggese G, Federico G. 2011. Nuclear damage in peripheral lymphocytes of obese and overweight Italian children as evaluated by the gamma-H2AX focus assay and micronucleus test. *FASEB J* 25(2):685-93.
- Schmitt E, Paquet C, Beauchemin M, Bertrand R. 2007. DNA-damage response network at the crossroads of cell-cycle checkpoints, cellular senescence and apoptosis. *J Zhejiang Univ Sci B* 8(6):377-97.
- Scott SP, Pandita TK. 2006. The cellular control of DNA double-strand breaks. *J Cell Biochem* 99(6):1463-75.
- Sedelnikova OA, Redon CE, Dickey JS, Nakamura AJ, Georgakilas AG, Bonner WM. 2010. Role of oxidatively induced DNA lesions in human pathogenesis. *Mutat Res* 704(1-3):152-159.
- Severin I, Jondeau A, Dahbi L, Chagnon MC. 2005. 2,4-Diaminotoluene (2,4-DAT)-induced DNA damage, DNA repair and micronucleus formation in the human hepatoma cell line HepG2. *Toxicology* 213(1-2):138-46.
- Sherer TB, Betarbet R, Testa CM, Seo BB, Richardson JR, Kim JH, Miller GW, Yagi T, Matsuno-Yagi A, Greenamyre JT. 2003. Mechanism of toxicity in rotenone models of Parkinson's disease. *J Neurosci* 23(34):10756-64.
- Sherer TB, Richardson JR, Testa CM, Seo BB, Panov AV, Yagi T, Matsuno-Yagi A, Miller GW, Greenamyre JT. 2007. Mechanism of toxicity of pesticides acting at complex I: relevance to environmental etiologies of Parkinson's disease. *J Neurochem* 100(6):1469-79.
- Simoniello MF, Kleinsorge EC, Scagnetti JA, Mastandrea C, Grigolato RA, Paonessa AM, Carballo MA. 2010. Biomarkers of cellular reaction to pesticide exposure in a rural population. *Biomarkers* 15(1):52-60.
- Singh NP, Stephens RE, Schneider EL. 1994. Modifications of alkaline microgel electrophoresis for sensitive detection of DNA damage. *Int J Radiat Biol* 66(1):23-8.
- Singh S, Kumar V, Thakur S, Banerjee BD, Chandna S, Rautela RS, Grover SS, Rawat DS, Pasha ST, Jain SK and others. 2011. DNA damage and cholinesterase activity in occupational workers exposed to pesticides. *Environ Toxicol Pharmacol* 31(2):278-85.
- Sirov V, Guérin T, Volatier JL, Leblanc JC. 2009a. Dietary exposure and biomarkers of arsenic in consumers of fish and shellfish from France. *Science of The Total Environment* 407(6):1875-85.
- Sirov V, Volatier JL, Calamassi-Tran G, Dubuisson C, Menard C, Dufour A, Leblanc JC. 2009b. Core food of the French food supply: second Total Diet Study. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 26(5):623-39.
- Slatter MA, Gennery AR. 2010. Primary immunodeficiencies associated with DNA-repair disorders. *Expert Rev Mol Med* 12:e9.
- Smart DJ, Ahmedi KP, Harvey JS, Lynch AM. 2011. Genotoxicity screening via the gammaH2AX by flow assay. *Mutat Res* 715(1-2):25-31.
- Smith CC, O'Donovan MR, Martin EA. 2006. hOGG1 recognizes oxidative damage using the comet assay with greater specificity than FPG or ENDOIII. *Mutagenesis* 21(3):185-90.

- Smith J, Tho LM, Xu N, Gillespie DA. 2010. The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. *Adv Cancer Res* 108:73-112.
- Solecki R, Davies L, Dellarco V, Dewhurst I, Raaij M, Tritscher A. 2005. Guidance on setting of acute reference dose (ARfD) for pesticides. *Food Chem Toxicol* 43(11):1569-93.
- Soliman KM. 2001. Changes in concentration of pesticide residues in potatoes during washing and home preparation. *Food and Chemical Toxicology* 39(8):887-91.
- Spink DC, Spink BC, Cao JQ, Gierthy JF, Hayes CL, Li Y, Sutter TR. 1997. Induction of cytochrome P450 1B1 and catechol estrogen metabolism in ACHN human renal adenocarcinoma cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 62(2-3):223-32.
- Srivastava N, Gochhait S, de Boer P, Bamezai RN. 2009. Role of H2AX in DNA damage response and human cancers. *Mutat Res* 681(2-3):180-8.
- Stark GR, Taylor WR. 2006. Control of the G2/M transition. *Mol Biotechnol* 32(3):227-48.
- Suzuki K, Kodama S, Watanabe M. 2009. Role of Ku80-dependent end-joining in delayed genomic instability in mammalian cells surviving ionizing radiation. *Mutat Res* 683(1-2):29-34.
- Suzuki K, Matsubara H. 2011. Recent advances in p53 research and cancer treatment. *J Biomed Biotechnol* 2011:978312.
- Takahashi M, Takeda J, Hirose S, Hyman R, Inoue N, Miyata T, Ueda E, Kitani T, Medof ME, Kinoshita T. 1993. Deficient biosynthesis of N-acetylglucosaminyl-phosphatidylinositol, the first intermediate of glycosyl phosphatidylinositol anchor biosynthesis, in cell lines established from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Exp Med* 177(2):517-21.
- Tanaka T, Huang X, Halicka HD, Zhao H, Traganos F, Albino AP, Dai W, Darzynkiewicz Z. 2007. Cytometry of ATM activation and histone H2AX phosphorylation to estimate extent of DNA damage induced by exogenous agents. *Cytometry A* 71(9):648-61.
- Tapryal N, Mukhopadhyay C, Mishra MK, Das D, Biswas S, Mukhopadhyay CK. 2010. Glutathione synthesis inhibitor butathione sulfoximine regulates ceruloplasmin by dual but opposite mechanism: Implication in hepatic iron overload. *Free Radic Biol Med* 48(11):1492-500.
- Tarantini A, Maître A, Lefèbvre E, Marques M, Rajhi A, Douki T. 2011. Polycyclic aromatic hydrocarbons in binary mixtures modulate the efficiency of benzo[a]pyrene to form DNA adducts in human cells. *Toxicology* 279(1-3):36-44.
- Thiebaud N, Menetrier F, Belloir C, Minn AL, Neiers F, Artur Y, Le Bon AM, Heydel JM. 2011. Expression and differential localization of xenobiotic transporters in the rat olfactory neuro-epithelium. *Neurosci Lett* 505(2):180-5.
- Thybaud V, Aardema M, Clements J, Dearfield K, Galloway S, Hayashi M, Jacobson-Kram D, Kirkland D, MacGregor JT, Marzin D and others. 2007. Strategy for genotoxicity testing: Hazard identification and risk assessment in relation to in vitro testing. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 627(1):41-58.
- Tomita M. 2010. Involvement of DNA-PK and ATM in radiation- and heat-induced DNA damage recognition and apoptotic cell death. *J Radiat Res (Tokyo)* 51(5):493-501.
- Tompkins LM, Wallace AD. 2007. Mechanisms of cytochrome P450 induction. *J Biochem Mol Toxicol* 21(4):176-81.
- Tressou J, Crepet A, Bertail P, Feinberg MH, Leblanc J. 2004a. Probabilistic exposure assessment to food chemicals based on extreme value theory. Application to heavy metals from fish and sea products. *Food Chem Toxicol* 42(8):1349-58.
- Tressou J, Leblanc J, Feinberg M, Bertail P. 2004b. Statistical methodology to evaluate food exposure to a contaminant and influence of sanitary limits: application to Ochratoxin A. *Regul Toxicol Pharmacol* 40(3):252-63.
- Trouiller B, Reliene R, Westbrook A, Solaimani P, Schiestl RH. 2009. Titanium dioxide nanoparticles induce DNA damage and genetic instability in vivo in mice. *Cancer Res* 69(22):8784-9.
- UIPP. 2008. Rapport d'activité 2007/2008, <http://www.uipp.org/>.
- UIPP. 2011. Rapport d'activité 2010/2011, <http://www.uipp.org/>.
- US-EPA. 2002. Tebufenpyrad, <http://www.epa.gov/opprd001/factsheets/tebufenpyrad.pdf>.

- Uygun U, Senoz B, Öztürk S, Koksel H. 2009. Degradation of organophosphorus pesticides in wheat during cookie processing. *Food Chemistry* 117(2):261-4.
- Valdiglesias V, Laffon B, Pasaro E, Mendez J. 2011a. Evaluation of okadaic acid-induced genotoxicity in human cells using the micronucleus test and gammaH2AX analysis. *J Toxicol Environ Health A* 74(15-16):980-92.
- Valdiglesias V, Méndez J, Pásaro E, Cemeli E, Anderson D, Laffon B. 2011b. Assessment of okadaic acid effects on cytotoxicity, DNA damage and DNA repair in human cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 689(1-2):74-79.
- van der Voet H, de Mul A, van Klaveren JD. 2007. A probabilistic model for simultaneous exposure to multiple compounds from food and its use for risk-benefit assessment. *Food Chem Toxicol* 45(8):1496-506.
- van der Voet H, van der Heijden GW, Bos PM, Bosgra S, Boon PE, Muri SD, Bruschiweiler BJ. 2009. A model for probabilistic health impact assessment of exposure to food chemicals. *Food Chem Toxicol* 47(12):2926-40.
- Van Leeuwen T, Van Pottelberge S, Tirry L. 2005. Comparative acaricide susceptibility and detoxifying enzyme activities in field-collected resistant and susceptible strains of *Tetranychus urticae*. *Pest Manag Sci* 61(5):499-507.
- Van Pottelberge S, Van Leeuwen T, Nauen R, Tirry L. 2009. Resistance mechanisms to mitochondrial electron transport inhibitors in a field-collected strain of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Bull Entomol Res* 99(1):23-31.
- Walker K, Ginsberg G, Hattis D, Johns DO, Guyton KZ, Sonawane B. 2009. Genetic polymorphism in N-Acetyltransferase (NAT): Population distribution of NAT1 and NAT2 activity. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 12(5-6):440-72.
- Wang Y, Prives C. 1995. Increased and altered DNA binding of human p53 by S and G2/M but not G1 cyclin-dependent kinases. *Nature* 376(6535):88-91.
- Watters GP, Smart DJ, Harvey JS, Austin CA. 2009. H2AX phosphorylation as a genotoxicity endpoint. *Mutat Res* 679(1-2):50-58.
- Weichenthal S, Moase C, Chan P. 2010. A review of pesticide exposure and cancer incidence in the Agricultural Health Study cohort. *Environ Health Perspect* 118(8):1117-25.
- West AG, van Attikum H. 2006. Chromatin at the crossroads. Meeting on signalling to chromatin epigenetics. *EMBO Rep* 7(12):1206-10.
- Westerink WMA, Schoonen WGEJ. 2007a. Cytochrome P450 enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells. *Toxicology in Vitro* 21(8):1581-91.
- Westerink WMA, Schoonen WGEJ. 2007b. Phase II enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells. *Toxicology in Vitro* 21(8):1592-602.
- Wetmore BA, Wambaugh JF, Ferguson SS, Sochaski MA, Rotroff DM, Freeman K, Clewell HJ, 3rd, Dix DJ, Andersen ME, Houck KA and others. 2011. Integration of Dosimetry, Exposure and High-Throughput Screening Data in Chemical Toxicity Assessment. *Toxicol Sci*.
- Whitwell J, Fowler P, Allars S, Jenner K, Lloyd M, Wood D, Smith K, Young J, Jeffrey L, Kirkland D. 2010. 5-Fluorouracil, colchicine, benzo[a]pyrene and cytosine arabinoside tested in the in vitro mammalian cell micronucleus test (MNvit) in Chinese hamster V79 cells at Covance Laboratories, Harrogate, UK in support of OECD draft Test Guideline 487. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 702(2):230-6.
- WHO. 2009. Assessment of combined exposures to multiple chemicals: report of a WHO/IPCS international workshop on aggregate/cumulative risk assessment.
- Wilkinson CF, Christoph GR, Julien E, Kelley JM, Kronenberg J, McCarthy J, Reiss R. 2000. Assessing the risks of exposures to multiple chemicals with a common mechanism of toxicity: how to cumulate? *Regul Toxicol Pharmacol* 31(1):30-43.
- Wirdefeldt K, Gatz M, Reynolds CA, Prescott CA, Pedersen NL. 2011. Heritability of Parkinson disease in Swedish twins: a longitudinal study. *Neurobiol Aging* 32(10):1923 e1-8.

- Wiseman H, Halliwell B. 1996. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J* 313 (Pt 1):17-29.
- Wu Q, Huang L, Liu Z, Yao M, Wang Y, Dai M, Yuan Z. 2011. A comparison of hepatic in vitro metabolism of T-2 toxin in rats, pigs, chickens, and carp. *Xenobiotica* 41(10):863-73.
- Xia M, Huang R, Witt KL, Southall N, Fostel J, Cho MH, Jadhav A, Smith CS, Inglese J, Portier CJ and others. 2008. Compound cytotoxicity profiling using quantitative high-throughput screening. *Environ Health Perspect* 116(3):284-91.
- Yang C, Tang X, Guo X, Niikura Y, Kitagawa K, Cui K, Wong ST, Fu L, Xu B. 2011a. Aurora-B Mediated ATM Serine 1403 Phosphorylation Is Required for Mitotic ATM Activation and the Spindle Checkpoint. *Mol Cell* 44(4):597-608.
- Yang G, Zhong L, Jiang L, Geng C, Cao J, Sun X, Liu X, Chen M, Ma Y. 2011b. 6-gingerol prevents patulin-induced genotoxicity in HepG2 cells. *Phytother Res* 25(10):1480-5.
- Yoshikawa T, Kashino G, Ono K, Watanabe M. 2009. Phosphorylated H2AX foci in tumor cells have no correlation with their radiation sensitivities. *J Radiat Res (Tokyo)* 50(2):151-160.
- Yuan J, Adamski R, Chen J. 2010. Focus on histone variant H2AX: to be or not to be. *FEBS Lett* 584(17):3717-24.
- Zalko D, Jacques C, Duplan H, Bruel S, Perdu E. 2011. Viable skin efficiently absorbs and metabolizes bisphenol A. *Chemosphere* 82(3):424-30.
- Zanelli U, Caradonna NP, Hallifax D, Turlizzi E, Houston JB. 2011. Comparison of Cryopreserved HepaRG Cells with Cryopreserved Human Hepatocytes for Prediction of Clearance for 26 Drugs. *Drug Metab Dispos*.
- Zeljezic D, Vrdoljak AL, Lucas JN, Lasan R, Fucic A, Kopjar N, Katic J, Mladinic M, Radic B. 2009. Effect of occupational exposure to multiple pesticides on translocation yield and chromosomal aberrations in lymphocytes of plant workers. *Environ Sci Technol* 43(16):6370-7.
- Zhang Z-Y, Pelletier RD, Wong YN, Sugawara M, Zhao N, Littlefield BA. 2006. Preferential inducibility of CYP1A1 and CYP1A2 by TCDD: Differential regulation in primary human hepatocytes versus transformed human cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 341(2):399-407.
- Zhou C, Li Z, Diao H, Yu Y, Zhu W, Dai Y, Chen FF, Yang J. 2006. DNA damage evaluated by gammaH2AX foci formation by a selective group of chemical/physical stressors. *Mutat Res* 604(1-2):8-18.
- Zhou SF, Wang B, Yang LP, Liu JP. 2010. Structure, function, regulation and polymorphism and the clinical significance of human cytochrome P450 1A2. *Drug Metab Rev* 42(2):268-354.
- Ziech D, Franco R, Pappa A, Panayiotidis MI. 2011. Reactive Oxygen Species (ROS)--Induced genetic and epigenetic alterations in human carcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 711(1-2):167-173.

Vanessa Graillet

Characterization of dietary exposure to pesticide mixtures and determination of their genotoxicological mechanisms of action.

Abstract

Consumers are exposed to several pesticide residues present simultaneously in food. This multi-exposure is insufficiently characterized and risk assessment procedures do not take into account appropriately the possible effects of contaminant mixtures. The purpose of this study was to investigate *in vitro* the genotoxic potential of pesticide mixtures relevant to the dietary exposure of the French population. In order to determine these mixtures, the French population co-exposure was estimated considering both food residue patterns originating from French food monitoring programs and French consumption survey (INCA2). Then, a statistic model was developed by ANSES to compare co-exposures, in order to define groups of individuals with similar pesticide exposure patterns. Based on these results, 7 relevant mixtures were determined and their genotoxic potential was screened in 4 different human cell lines (ACHN, HepG2, LS-174T, SHSY-5Y), using the genotoxic H2AX assay. Mixtures were tested at both equimolar concentrations and proportions reflecting the real diet contamination. The results were compared with the effects of individual compounds. One mixture, consisting of 5 compounds, was found to be genotoxic, only for HepG2. Data obtained with individual compounds showed that only two compounds from the mixture, namely fludioxonil and cyprodinil, were genotoxic. A mixture effect was observed at low doses. The screening of additional pesticides selected from the co-exposure characterization allowed to identify a family of pesticides (methyl-pyrazoles) able to induce DNA double strand break on two human cell lines (Jurkat/SH-SY5Y).

Keywords: Pesticides – Mixtures – H2AX – Genotoxicity – Food exposure

Vanessa Grailot

Appréciation quantitative de l'exposition alimentaire à des mélanges de pesticides et mécanismes de génotoxicité

DIRECTEURS DE THESE :

Dr Jean-Pierre Cravedi
Dr Jean-Charles Leblanc

DATE DE SOUTENANCE :

9 février 2012

Les consommateurs sont exposés à plusieurs résidus de pesticides présents simultanément via leur alimentation. L'exposition réelle des consommateurs aux mélanges de pesticides est mal connue, et l'évaluation des risques prend rarement en compte les effets possibles d'une multi-exposition à ces composés. L'objectif de ce travail de thèse était d'étudier *in vitro* le potentiel génotoxique de mélanges de pesticides, déterminés à partir de l'exposition alimentaire de la population française. Pour déterminer ces mélanges de pesticides, la co-exposition a été évaluée à partir de données provenant des plans nationaux de surveillance et de contrôle des résidus de pesticides dans les aliments, couplées aux données de consommation individuelle française (enquête INCA2). Un modèle statistique développé à l'ANSES a comparé ces co-expositions aux pesticides, et a défini des groupes d'individus aux niveaux d'exposition semblables. A partir de ces données, sept mélanges de pesticides ont été déterminés et leur potentiel génotoxique a été étudié sur quatre lignées cellulaires humaines (ACHN, HepG2, LS-174T, SH-SY5Y), à l'aide du test de génotoxicité H2AX. Ces mélanges ont été testés en proportions équimolaires et aux proportions reflétant l'exposition de la population. Les résultats obtenus ont été comparés avec l'effet des composés individuels. Seul un mélange, constitué de 5 composés, est génotoxique et uniquement sur la lignée HepG2. Par ailleurs, les résultats ont montrés que seul, deux composés du mélange, fludioxonil cyprodinil, sont génotoxiques. Il a également été montré un effet du mélange à faibles doses. De plus, l'analyse du potentiel génotoxique de 14 autres pesticides seuls, également sélectionnés à partir de la co-exposition, a permis d'identifier une famille de pesticides (méthyl-pyrazoles) capable d'induire des cassures double brin d'ADN sur deux lignées cellulaires humaines (Jurkat/ SH-SY5Y).

Mots clés : Pesticides - Mélanges - H2AX – Génotoxicité – Exposition alimentaire

ED SEVAB : Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

INRA-ENVT UMR 1331 TOXALIM

ANSES

Equipe Mex (Métabolisme des xénobiotiques)

Département d'évaluation des risques

180 Chemin de Tournefeuille BP 93173

27-31 avenue du Général Leclerc

31027 - Toulouse

94701 Maisons-Alfort