



Laurence Payraastre
INRA, département AlimH

Effets physiopathologiques des mélanges de pesticides

Différents types d'exposition aux Pesticides

□ Professionnelle

Usage agricole (90%): 1.3 millions de personnes (X2 avec les retraités)

□ Non professionnelle

- Utilisation des pesticides « ménagers »

- traitement des parasites dans la maison
- traitement des bois et textiles
- soins des animaux
- traitement des plantes d'intérieurs, jardins, espaces verts

- Alimentation :

Dans l'Union Européenne 49,5% des fruits et légumes contiennent des pesticides

Résidus de Pesticides - UE: Les nouvelles données sur la présence des pesticides dans les aliments. (EFSA, scientific report, 2009)

Des facteurs de risques pour la santé

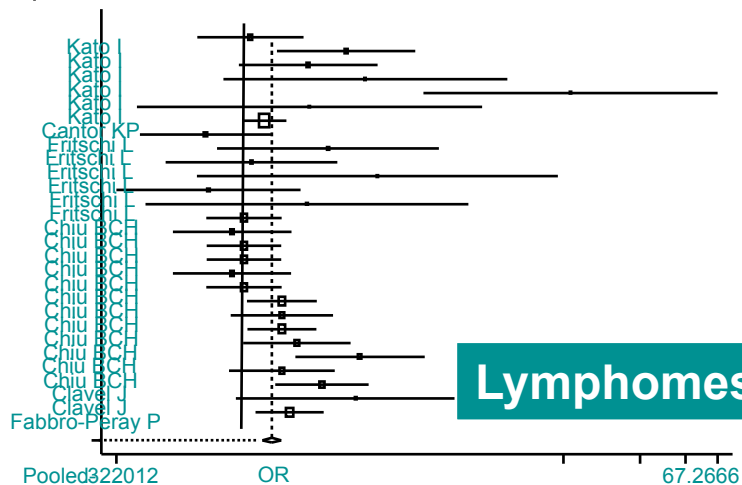
Corrélation:

exposition professionnelle aux pesticides

risque accru de troubles de la santé

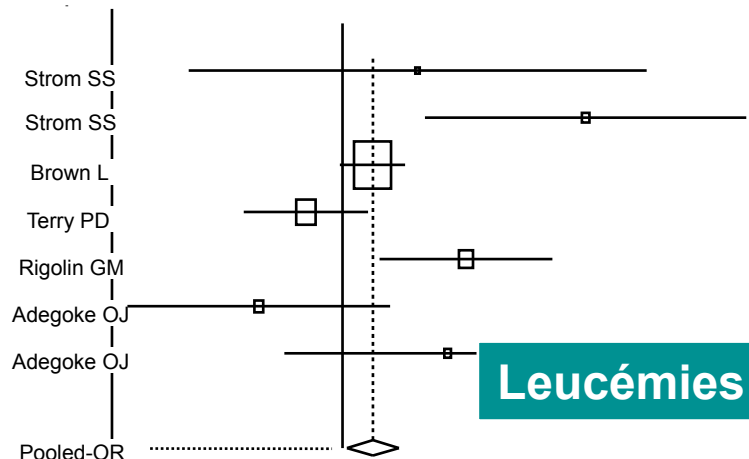
Meta-analyse d'études épidémiologiques (13 études) Incidence des cancers hématopoïétiques dans les populations professionnellement exposées aux pesticides

M. Merhi, *Cancer Causes Control*, 18, 1209-12, 2007

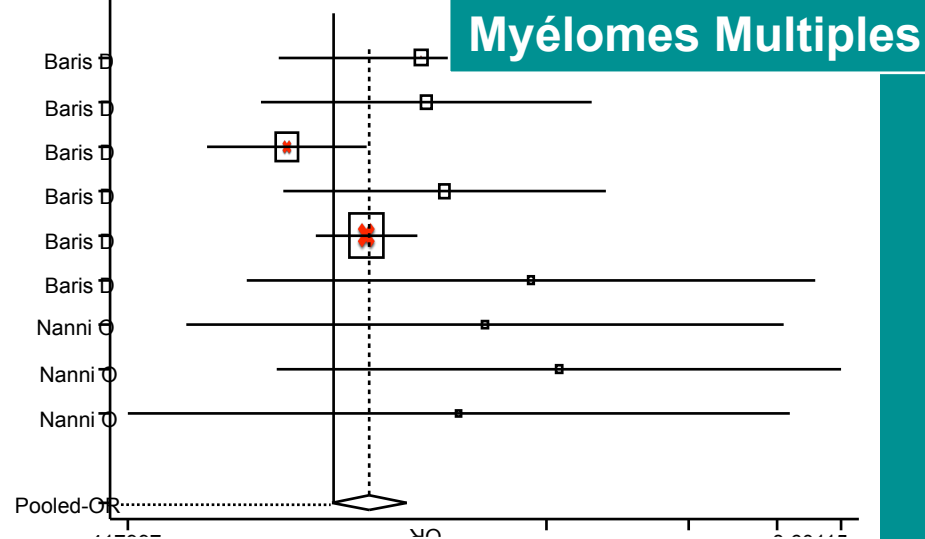


- l'exposition professionnelle aux pesticides entraîne une augmentation de 35 % du risque de développer les NHL
- l'exposition professionnelle aux pesticides tend à augmenter l'incidence des leucémies ou myélomes multiples

OR Total = 1.35 (95% CI= 1.2-1.5)



OR Total = 1.35 (95 % CI = 0.9-2)



OR Total = 1.16 (95 % CI = 0.99-1.36)

Forrest plot montrant les différentes valeurs de risque (OR) obtenues dans chaque étude et réparties le long d'un axe de valeur 1. Estimation de l'OR total (pooled OR).

Exposure to pesticides and risk of childhood cancer: a meta-analysis of recent epidemiological studies

Florence Vinson, Maysaloun Merhi, Hélène Raynal, Isabelle Baldi and L. Gamet-Payraastre (*Occup Environ Med submitted*)

40 articles (1985-2009), 304 estimations du risque (OR)

Exposition prénatale

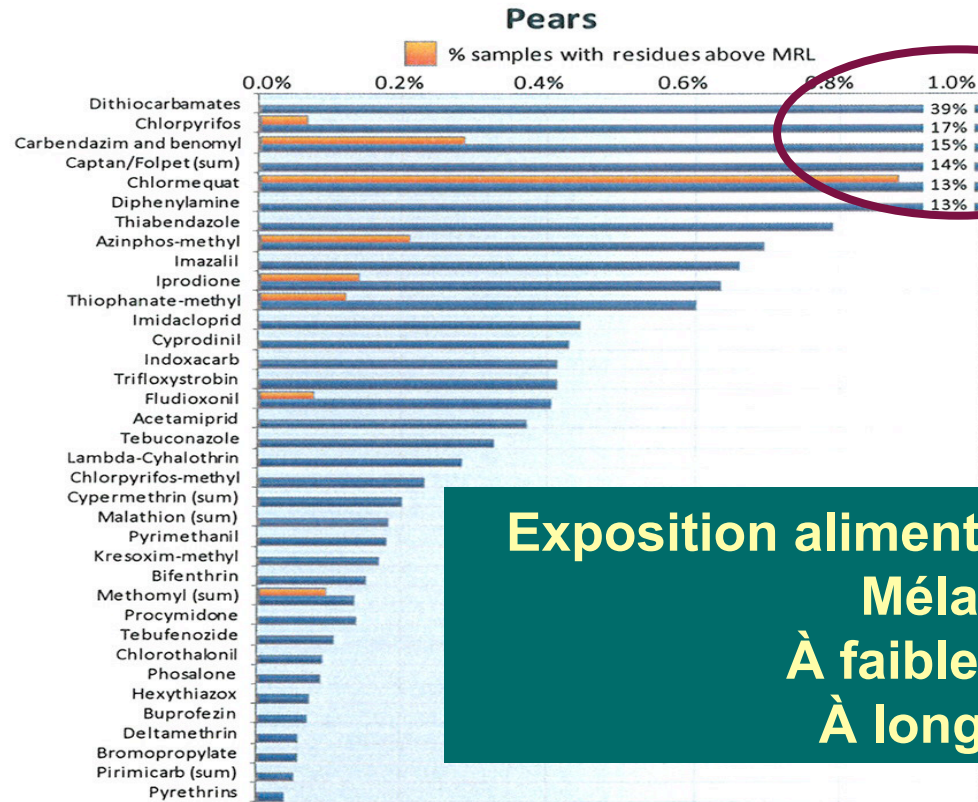
• des mères

- ↑ 53% risque de lymphomes (5 études) OR **1.53**; 95%CI 1.22-1.91
- ↑ 48% risque de leucémie (25 études) OR **1.48**; 95%CI 1.26-1.75

• du père

- ↑ 49% risque de cancer du cerveau (9 études) OR **1.49**; 95%CI 1.23-1.79
- ↑ 32% risque de leucémie (19 études) OR **1.32**; 95%CI 1.20-1.46
- ↑ 37% risque de lymphomes (9 études) OR **1.37**; 95%CI 1.16-1.61

**Importance de la période prénatale
en terme d'exposition aux facteurs de risques**



Exposition alimentaire aux pesticides
Mélanges
À faibles doses
À long terme

Mélanges de pesticides: Quel risque pour le consommateur et sa descendance?

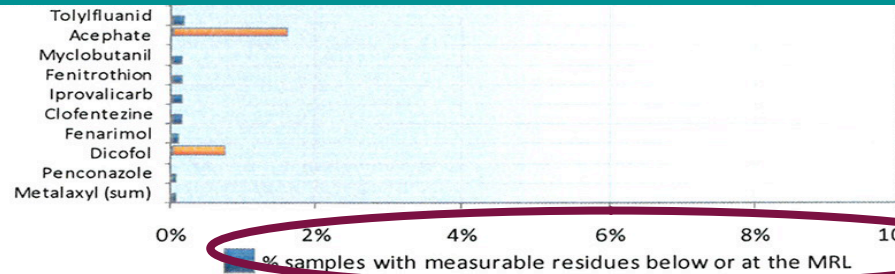


Figure 3.4-6: Percentage of samples of pears above the MRL (upper scale) or with measurable residues below or at the MRL (lower scale) by pesticide for the 2008 EU coordinated programme. Total number of samples: 1,669.

Mélanges de pesticides: Quel risque pour le consommateur et sa descendance?

Il est difficile de mettre en évidence une relation de causalité entre pesticides et santé chez le consommateur

■ Les composés

Combinaison infinie de molécules, difficulté d'identifier les produits incriminés, d'évaluer les interactions entre substances et d'évaluer les effets cumulatifs tout au long de l'année

■ Les individus

Susceptibilité individuelle - fréquence d'exposition différente /individu/an

■ Les pathologies

Origine multifactorielle et Degré de contribution de l'environnement à l'incidence d'une pathologie (de 2 à 80 %??)

Choix des mélanges de pesticides « représentatifs » différents critères

- **liés à l'appartenance des composés à une même famille chimique** (*Payne J, 2001*), **métabolites** (*Zeljezic D., 2007; Enoch RR, 2006*)

- **expologiques** issus de données

- de modélisation (*Stork LG, 2006; Carpy SA, 2000, Kortenkamp A, 2007*)

- d'utilisation actuelle (*afsset, 2007*)

- d'analyse de molécules des fluides biologiques (*Padhi BK, 2007*)

- *d'analyse de pesticides présents dans l'alimentation ou l'eau*
(*Lodovici M, 1994; Ito N, 1995; Dolara P, 2004, Thorpe N, 2005, Perez Careon, J, 2009*)

- **liés aux cibles cellulaires ou physiologiques communes**

(*Jonker D, 1993, Marinovich M, 1999, Mumtaz, MM, 2002; Canistro D, 2008*)

Effet des mélanges de pesticides:

Hypothèse :

absence d'effet des mélanges quand les composés sont présents aux doses correspondant à leur NOAEL (No Observable Adverse Effect Levels) et lorsqu'ils agissent via des mécanismes d'action différents

Kortenkamp A, 2008 Ride CV, 2010

*cas des perturbateurs endocriniens
cas de la fonction de reproduction*

- Effets significatifs des mélanges à des doses inférieures aux valeurs de la NOAEL
- Effets cumulatifs « dose additive » des mélanges de composés qui ont pour cible le même tissu
- que les composés agissent via des mécanismes d'action similaires ou différents

Effet des mélanges de pesticides:

	Composés Et doses testées	Modèle expérimentale	Effets observés
Valeron PF 2009	OC sériques concentrations sériques	In vitro cellules mammaires normales 96 heures	cytotoxicité Effet Mélange OC non dérivés du DDT > seul Seul > Effet Mélange OC dérivés du DDT <
Perobelli JE 2010	pesticides de l'aliment LOAEL, LOEL LEL	Rats 8 semaines	Effet additif ou pas d'effet du mélange selon le paramètre étudié de la reproduction

HETEROGENEITE des résultats

Pas de conclusions définitives généralisable

à tous les mélanges

	0 a 100 mg/kg/j		dependant de la fonction ou du paramètre étudié
Perez Carreon JI 2009	12 pesticides de l'alimentation DJA humaine	Hepato-carcinogénicité Rat gavage	Pas d'effet du mélange quant à sa potentialisation de la cancérogenèse
Padhi BK 2008	Northern Contaminant mixture (OC, PCB, MeHg)	Rat Cerebellum Exposition périnatale 14 j	Pas d'effet du mélange Effet des molécules seules sur l'expression génique

Impact d'une exposition à des mélanges de pesticides à faibles doses

Critères de choix

- Présents dans l'alimentation et/ou l'eau
- Présentant des effets sur des cibles cellulaires ou physiologiques communes

- Chez l'adulte
- Dans la descendance

Impact des mélanges de pesticides à faibles doses sur l'hématopoïèse in vivo chez la souris

Merhi M, C. Demur, C. Racaud-Sultan, J. Bertrand, C. Canlet F. Blas v Estrada and L. Gamet-Pavrastrre. *Toxicoloav. 2010*

Tested pesticides	ADI mg/kgbw/day	NOAEL mg/kg/day
alachlor	0.0005	1
diazinon	0.002	2.5
endosulfan	0.006	0.6
maneb	0.05	11
Mancozeb	0.05	4.08
captan	0.1	11

DJA des 6 pesticides testés “monograph and evaluation of pesticide” du Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues (JMPPR, 2005).

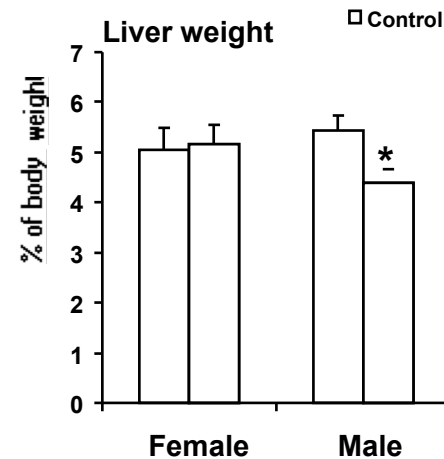
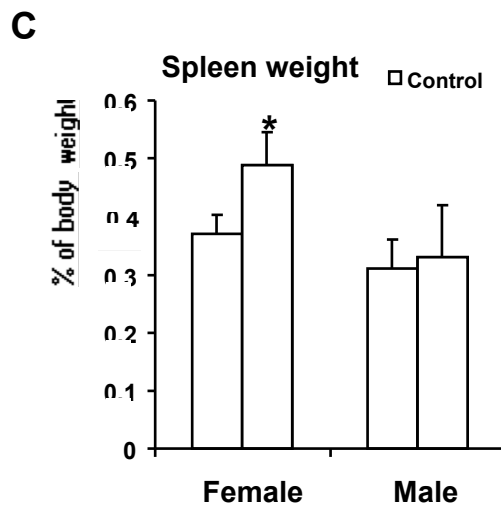
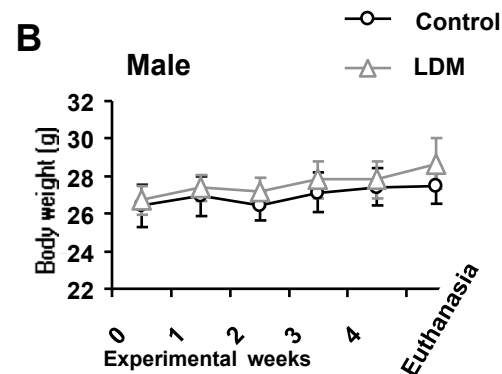
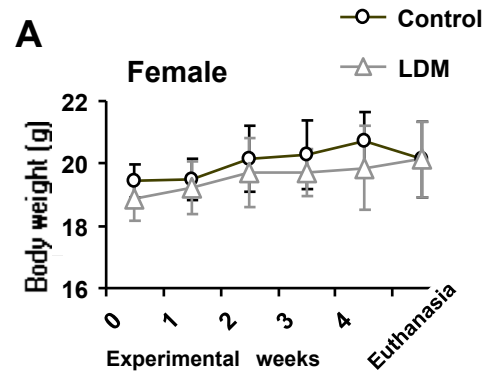
Références bibliographiques relatives aux effets des pesticides sur le stress oxydant, l'apoptose, les **pathologies hématopoïétiques**, les dommages à l'ADN et sur la signalisation cellulaire. ND= aucune donnée bibliographique.

- 1 (Burman, Shertzer et al. 2003)
- 2 (Grizard, Ouchchane et al. 2007)
- 3 (Suzuki, Nojiri et al. 2004)
- 4 (Slotkin and Seidler 2009)
- 5 (Ahmed, Tripathi et al. 2008)
- 6 (Domico, Cooper et al. 2007)
- 7 (Ahmad, Kumar et al. 2008)
- 8 (Cakir and Sarikaya 2005)
- 9 (Liu, Zhu et al. 2009)
- 10 (Osaba, Rey et al. 2002)
- 11 (Mouchet, Gauthier et al. 2006)
- 12 (Khan and Sinha 1994)
- 13 (Fei and Ethell 2008)
- 14 (Calviello, Piccioni et al. 2006)
- 15 (Lee, Hoppin et al. 2004)
- (Lee, Blair et al. 2004)
- 18 (Petri, Glover et al. 2006)
- 19 (Mills, Yang et al. 2005)
- 20 (Whalen, Loganathan et al. 2003)
- 21 (McDuffie, Pahwa et al. 2001)
- 22 (Mills 1998)
- 23 (Ohnishi, Yoshida et al. 2008)
- 24 (Sekine, Yamamoto et al. 2004)
- 25 (Xue, Xu et al. 2005)
- 26 (Cecconi, Paro et al. 2007)
- 27 (Subramoniam, Agrawal et al. 1991)

Mélanges de 6 pesticides

- Chez la souris
- Dose journalière
- Par gavage

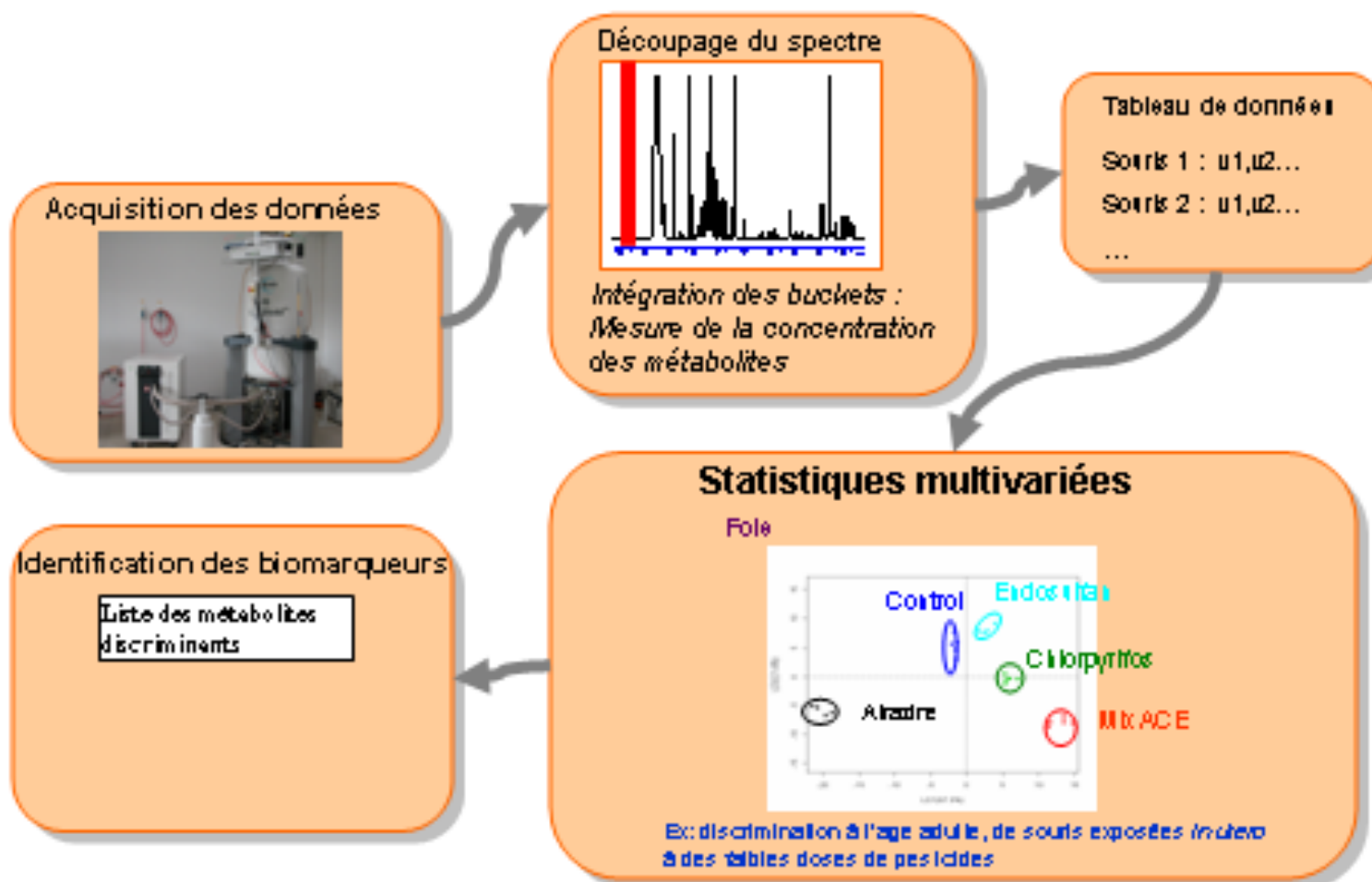
Mixture (LDM)



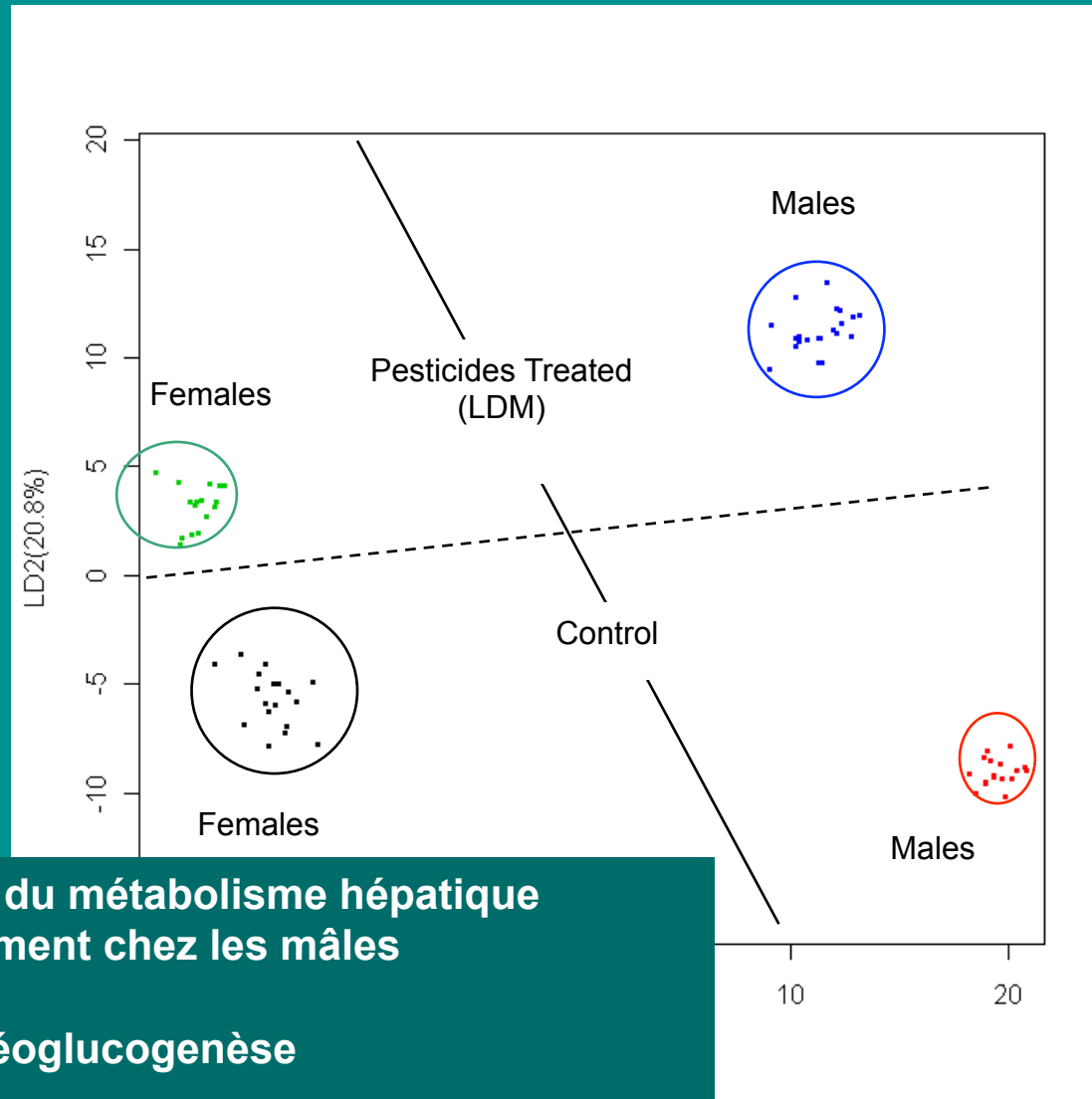
Métabonomique

C. Canlet, Axiom

Empreintes métaboliques (RMN)



Empreinte métabolique hépatique chez les souris traitées (LDM) avec le mélange de 6 pesticides



**Variations du métabolisme hépatique
principalement chez les mâles**

- mâles: néoglucogénèse

- femelles: Métabolisme du glycogène
Métabolites liés au stress oxydatif

obtenus en RMN

14 jours



Dissection des tibias et fémurs



Récupération et mise en culture de la moelle osseuse

- Comptage des colonies (CFU-GM, CFU-M, BFU-E)

- Analyse le % de cellules dans les différents stade de maturation

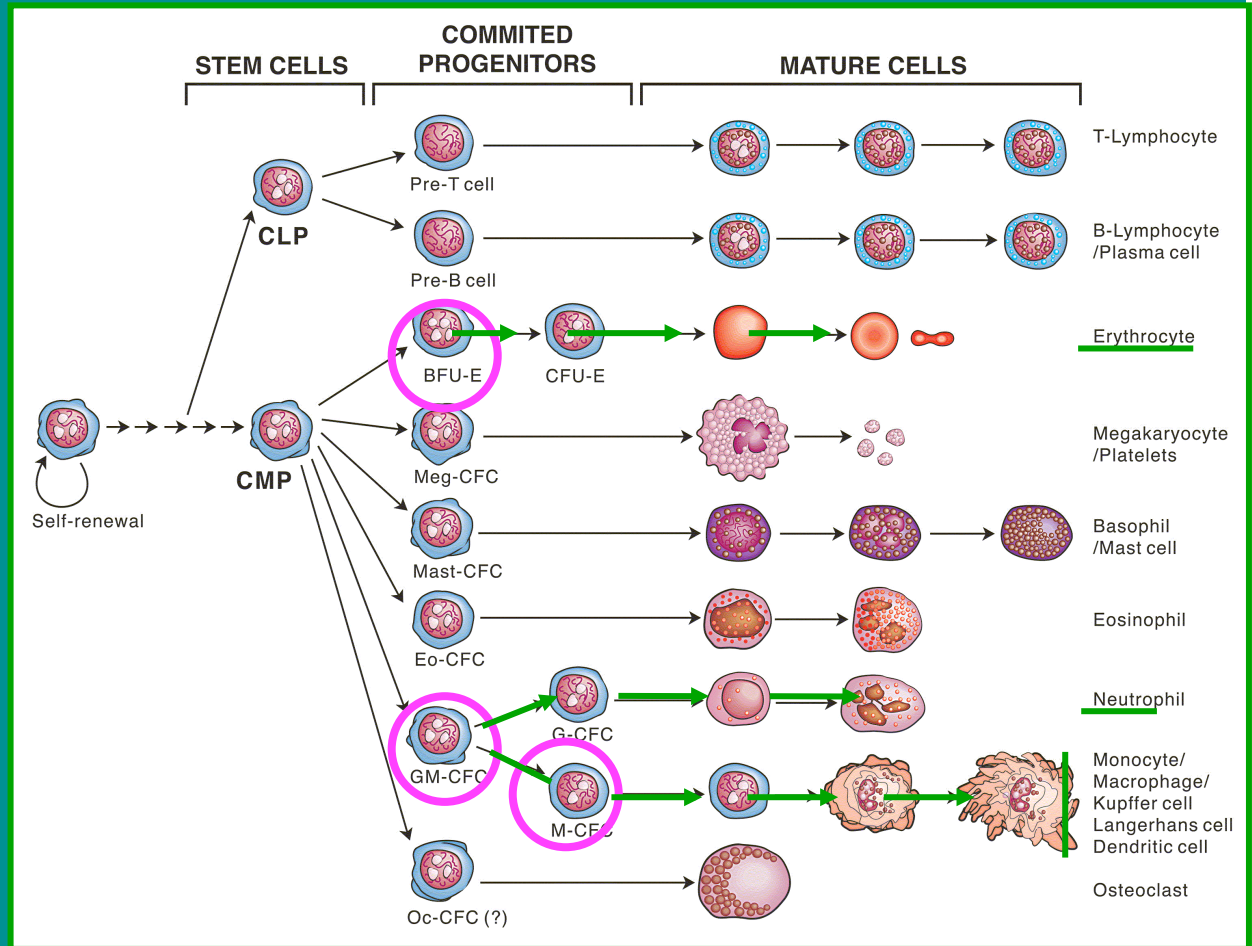
C. Demur

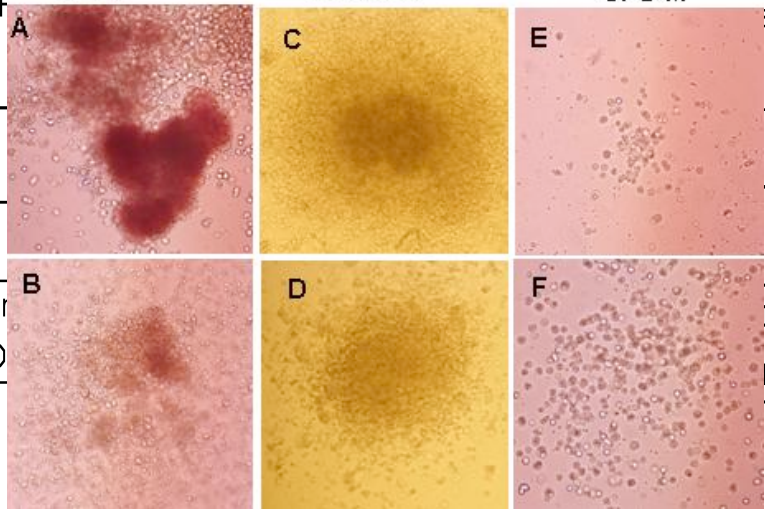
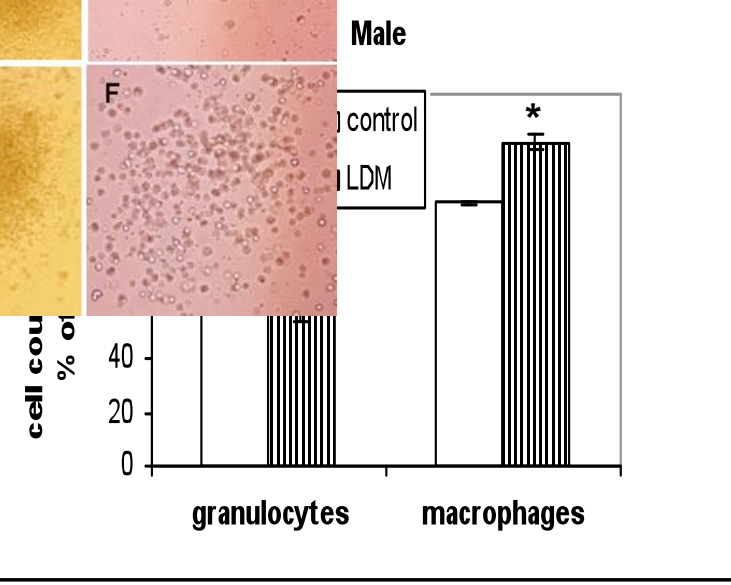
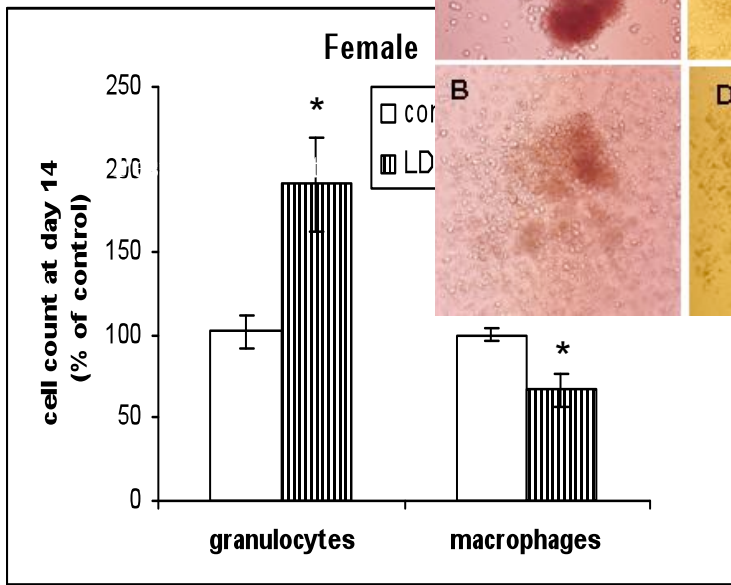
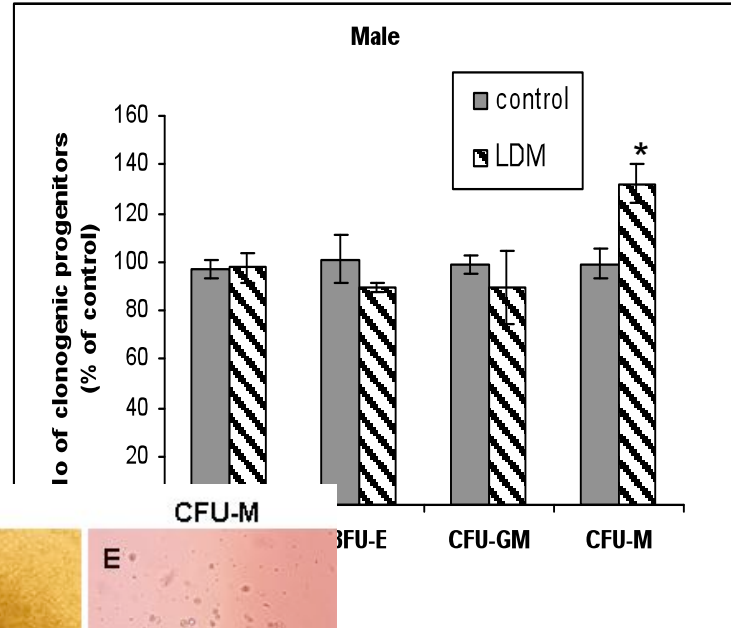
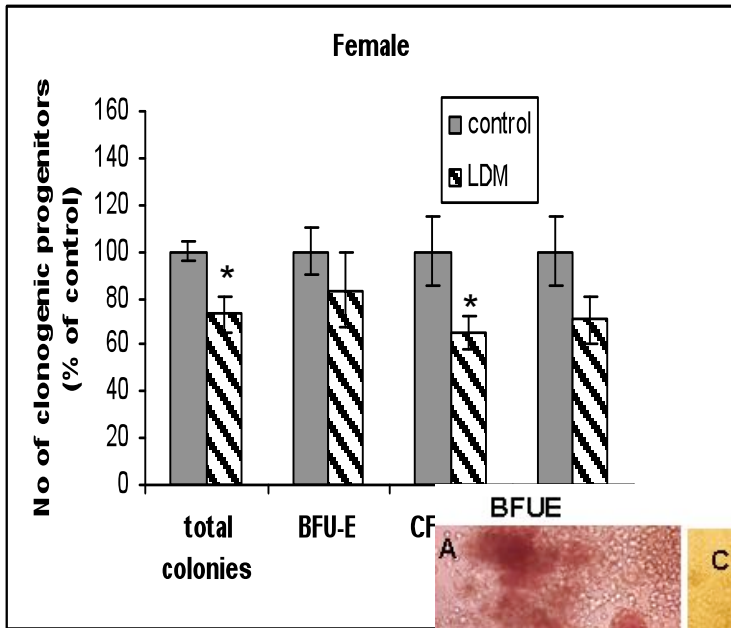
Laboratoire d'hématologie
CHU Toulouse Purpan

Hématopoïèse

Clonogénicité/différenciation

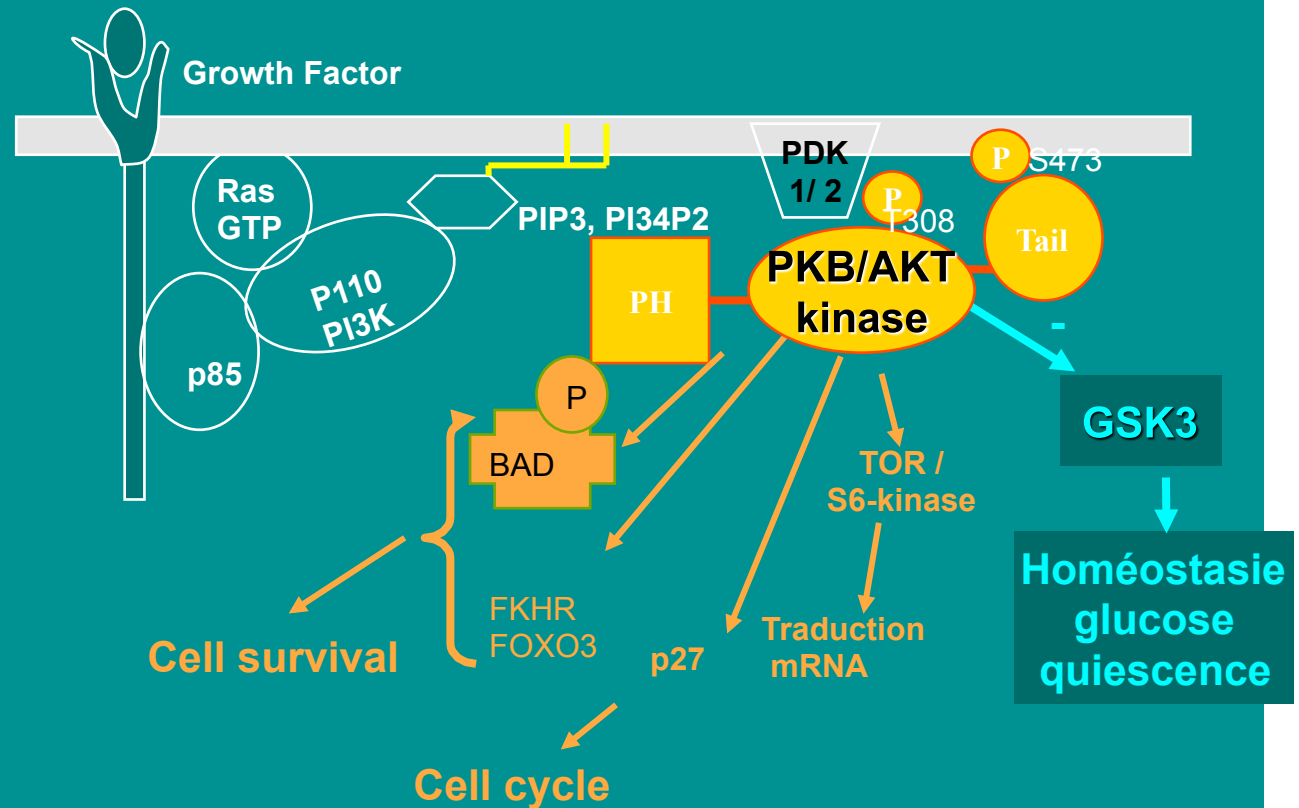
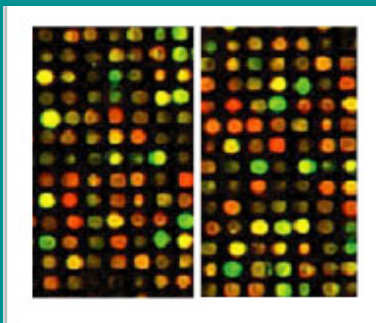
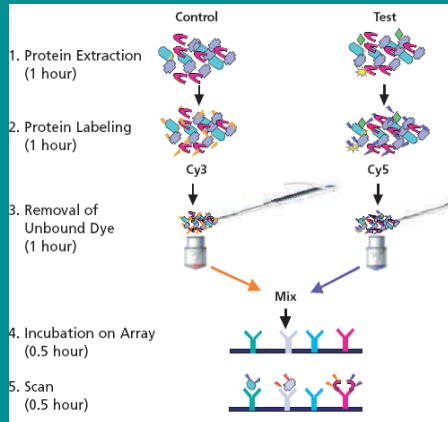
myéloïde, In vitro





Étude de la signalisation dans les progéniteurs issus des souris traitées comparativement aux contrôles

Sélection des progéniteurs hématopoïétiques

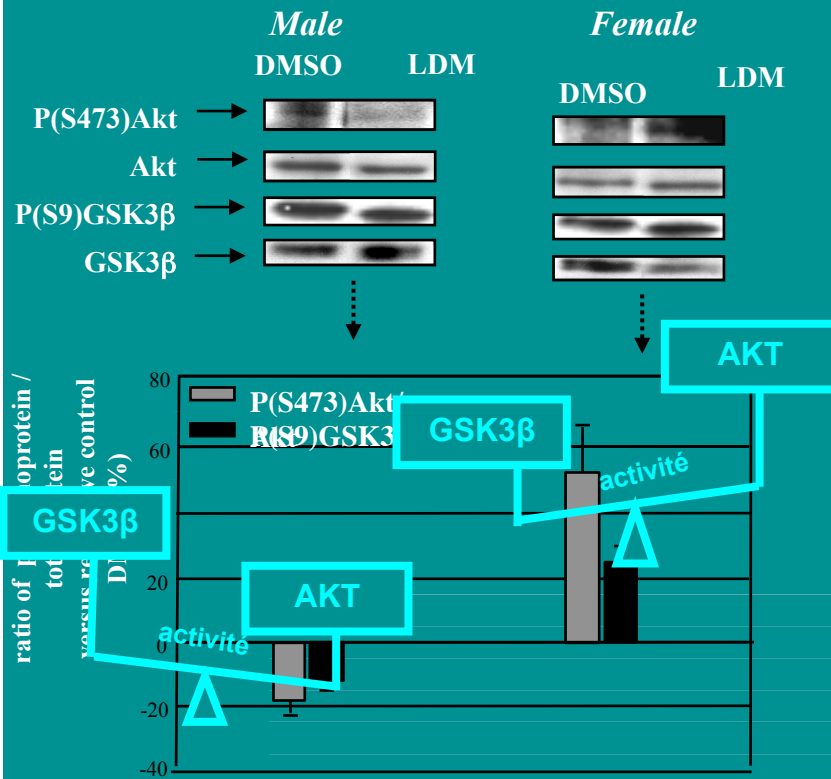


Taux de phosphorylation des protéines AKT et GSK3 β

C. Racaud-Sultan
INSERM U563 Toulouse

Antibody microarray 224 protéines « cell signaling »

Étude de la signalisation dans les progéniteurs



Taux de phosphorylation des protéines **AKT (phosphoactive)** et **GSK3 (inactive)** dans les progéniteurs Issues de souris traitées avec les pesticides (versus contrôle)

		Female		Male	
		INR ¹	log (INR)	INR	log (INR)
Total proteins	Mean +2SD	1.21	0.28	1.07	0.11
	Mean -2SD	0.79	-0.29	0.92	-0.12
Significantly affected proteins	c-Myc	1.26	0.33	-	-
	Cyclin D1	1.21	0.28	1.07	0.11
	PKB/Akt	0.79	-0.48	-	-
	Pyk2 - pTyr ⁵⁸⁰	0.79	-0.33	0.88	-0.19

Expression des protéines dans les progéniteurs Issues de souris traitées avec les pesticides (versus contrôle)

Mélange de 6 pesticides à faible dose pendant 4 semaines

- ❑ Empreinte métabolique hépatique spécifique
- ❑ Modification de la capacité de différenciation des cellules souches différentielle selon le sexe de l'animal
- ❑ Perturbation de certaines voies de signalisation

Étude de l'impact d'une exposition à un mélange de pesticide à faibles doses dans la descendance

❑ mieux mimer l'exposition du consommateur

Pesticide mélangé à l'aliment à la dose journalière admissible adaptée au poids des souris

❑ fenêtre critique d'exposition aux pesticides

Rechercher l'impact de l'exposition pré et/ou postnatale

❑ Comparaison effet pesticides seuls/effet du mélange (atrazine chlorpyrifos et endosulfan)

- Hématopoïèse
- Système nerveux central
- Immunité
- homéostasie métabolique

Projets soutenus par l'Afsset et l'ANR

Aliment enrichi en pesticide /DJA humaine

contrôle

Atrazine (A) 0.025mg/kg alim

Chlorpyrifos (C) 0.05 mg/kg alim

Endosulfan (E) 0.03 mg/kg alim

Mélange (ACE)

Alimentation des mères

Alimentation des F1

accouplement

naissance

sevrage

11 semaines

Gestation

lactation

PROTOCOLE EXPERIMENTAL

hématopoïèse

Immunité

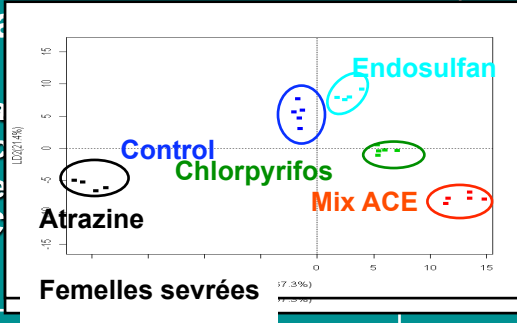
SNC

Souriceaux sevrés

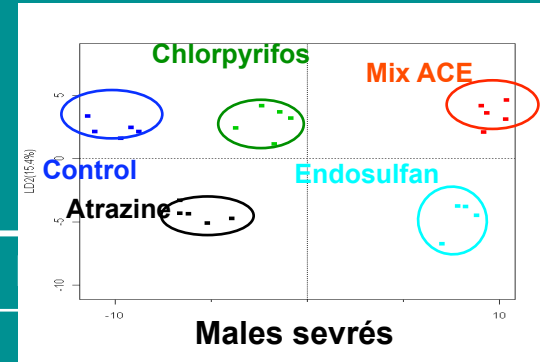
1 expérimentation

6 a

Aa
Cc
Ee
AC



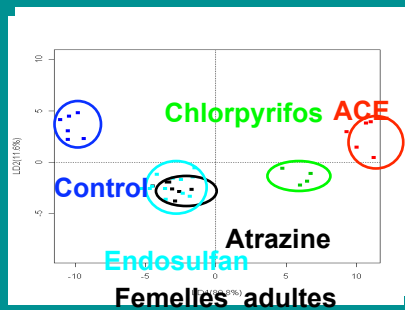
topoïèse centrale-périphérique



Souris adultes

2 expérimentations

10 à 16 animaux



- ♀
- E ↑ des GM ↑réticulocytes ↓Hb
 - A ↑ des GM et BFU-E ↑réticulocytes ↓Hb
 - C ↓ des GM ↑WBC (PNN) ↑réticulocytes ↓Hb mobilisation

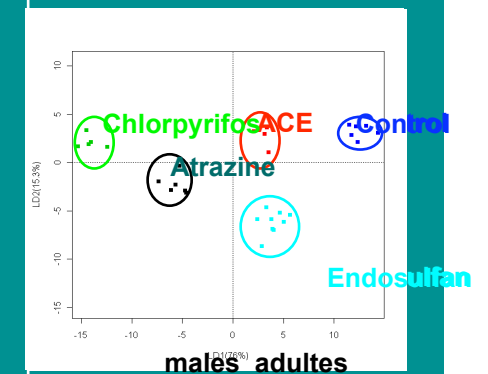
ACE ↑réticulocytes

- E ↑ des GM et des BFU-E ↑ des réticulocytes ↓ Taux H
- A ↓ Taux Hb

Diminution de la réponse immunitaire (C)

Modification des propriétés des neurones pré synaptiques

ACE



Ces résultats

- **Témoignent d'un impact**

- **de l'exposition maternelle (placenta ou lait maternel)**
- **de l'exposition postnatale (le tractus digestif)**

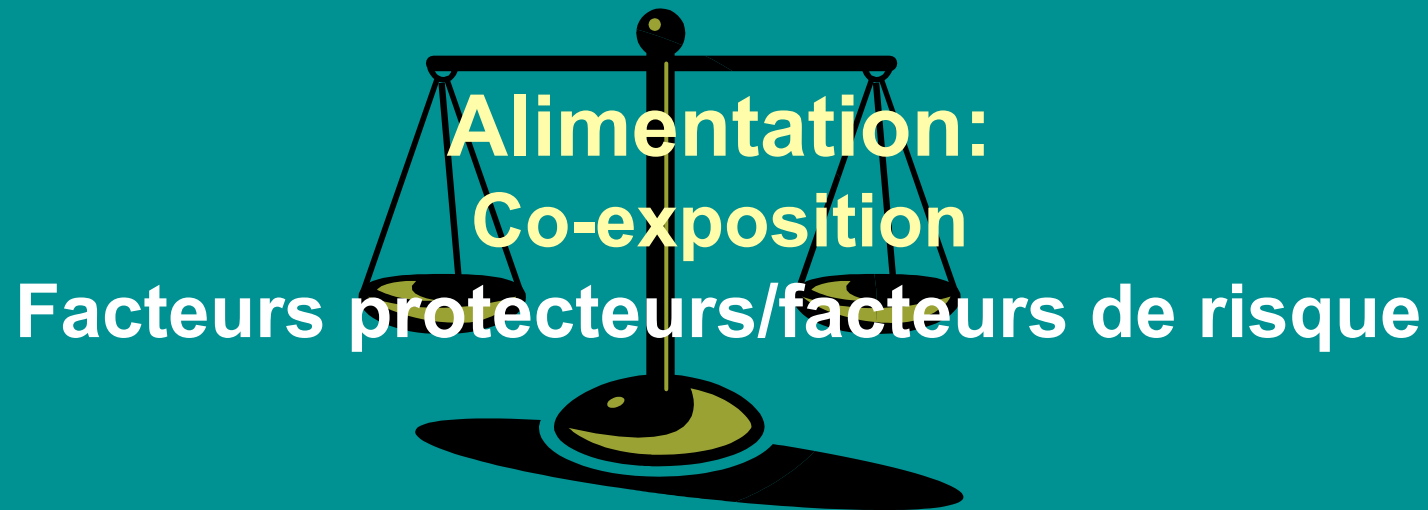
aux pesticides seuls à faibles doses

- **Soulignent la complexité de l'effet des mélanges**
- **Soulignent la nécessité de poursuivre ce type d'étude**

“To explain this mind-boggling complexity will require the design of novel experimental approaches that integrate the effects of different doses of widely structurally different chemicals acting at different ages on different target tissues having different susceptibilities to those diverse compounds.

Mathematical modeling tools and computer simulations afforded by system biological approaches may help in the understanding of this complex problem”

Soto A.M. and Sonnenschein C, Nature review 2010



*(Valentich MA 2006; Gorce Uzun F 2010; Pico Y 2007; Bebe FN 2008;
Tope AM 2009; Foster WG 2004; Panemangalore M 2010)*



INRA

UMR Xénobiotiques

Hématopoïèse (fonctionnelle et mécanistique) : *B. Métais*

Expérimentation animale : Blas-Y-estrada

Métabonomique (plateforme AXIOM): C. Canlet R Gautier J. Molina



U563, Toulouse

Hématologie C Demur



INRA

UR 66

Immunité : I. Oswald, J. Lafitte, L. Gusilak



Neurotoxicité : Neuroservice (Marseille) B. Buisson, EM Steidl



INRA

Sophia Antipolis

Études mécanistiques in vitro

R. Rahmani, G. Desousa, N. Zucchini