



Carrefours de l'innovation  
agronomique



# Contaminants alimentaires : approches émergentes pour connaître et prévenir le risque

19 décembre 2018 | APCA, Avenue George V | PARIS

# Mycotoxines et métaux lourds : co-contamination et toxicité croisée

Isabelle P. OSWALD et  
Florence FORGET-RICHARD

*TOXALIM - Toxicologie Alimentaire*  
*INRA - Toulouse*



*MYCSA – Mycotoxines et Sécurité des Aliments*  
*INRA - Bordeaux*

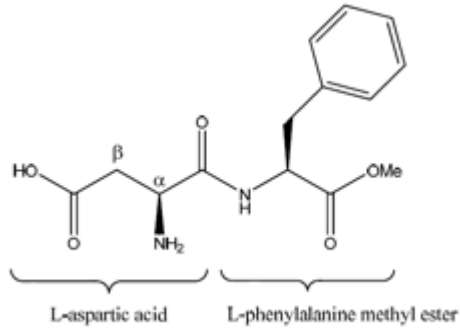


Carrefours de l'innovation  
agronomique

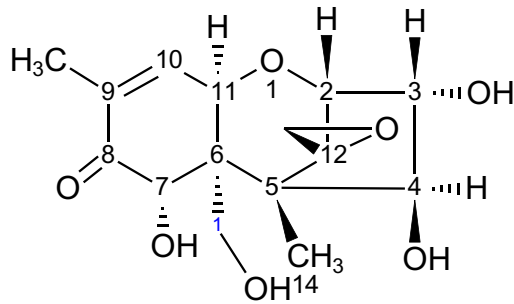


19 décembre 2018  
APCA, PARIS

# Les contaminants chimiques dans les aliments



- Substances et denrées soumises à autorisation :
  - Additifs alimentaires, Pesticides, Médicaments vétérinaires, etc...
  - Demande d'autorisation de mise sur le marché : dossier toxicologique très fourni

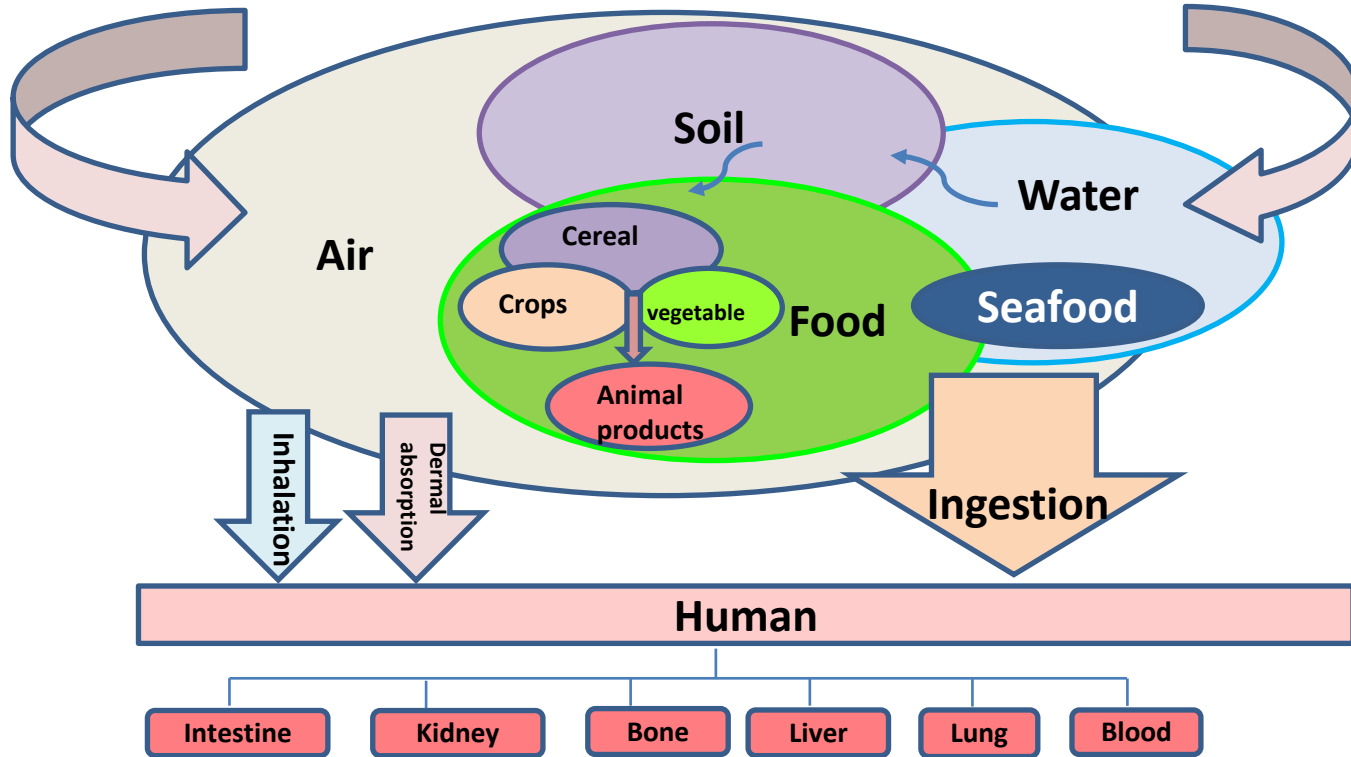


- Contaminants naturels
  - **Mycotoxines**, Phycotoxines, **Métaux lourds**, etc...
  - Aucune demande d'autorisation : aucun dossier toxicologique digne de son nom

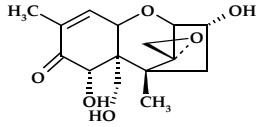
# Elements Traces Métalliques

- Composants **naturels** de la croûte terrestre, **non-dégradable**
- En tant qu'oligo-éléments, certains métaux lourds (comme le cuivre, le sélénium et le zinc) sont **essentiels au métabolisme**. À des concentrations plus élevées, ils peuvent être **toxiques**.
- L'intoxication par les métaux lourds peut provenir de **l'eau de boisson** (comme les tuyaux en plomb), de **l'air** ambiant (à proximité des sources d'émission) ou de l'ingestion via la **chaîne alimentaire**
- Les métaux les plus courants sont le plomb (Pb), le mercure (Hg), le cadmium (Cd) et l'arsenic (As)

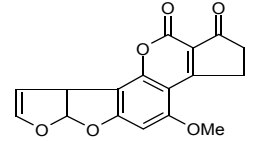
# Cadmium (Cd)



# Les mycotoxines

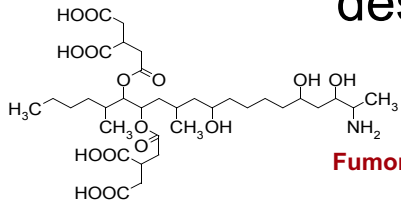


**Deoxynivalenol**

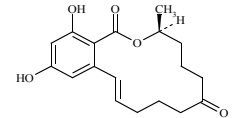


**Aflatoxine B1**

- Toxines produite par un champignon
- Plus de 1000 mycotoxines décrites, une trentaine avec des effets préoccupants
- Structure chimique très diverse
- Structure chimique et propriétés toxiques conservées au cours du stockage et de la transformation/cuisson des aliments

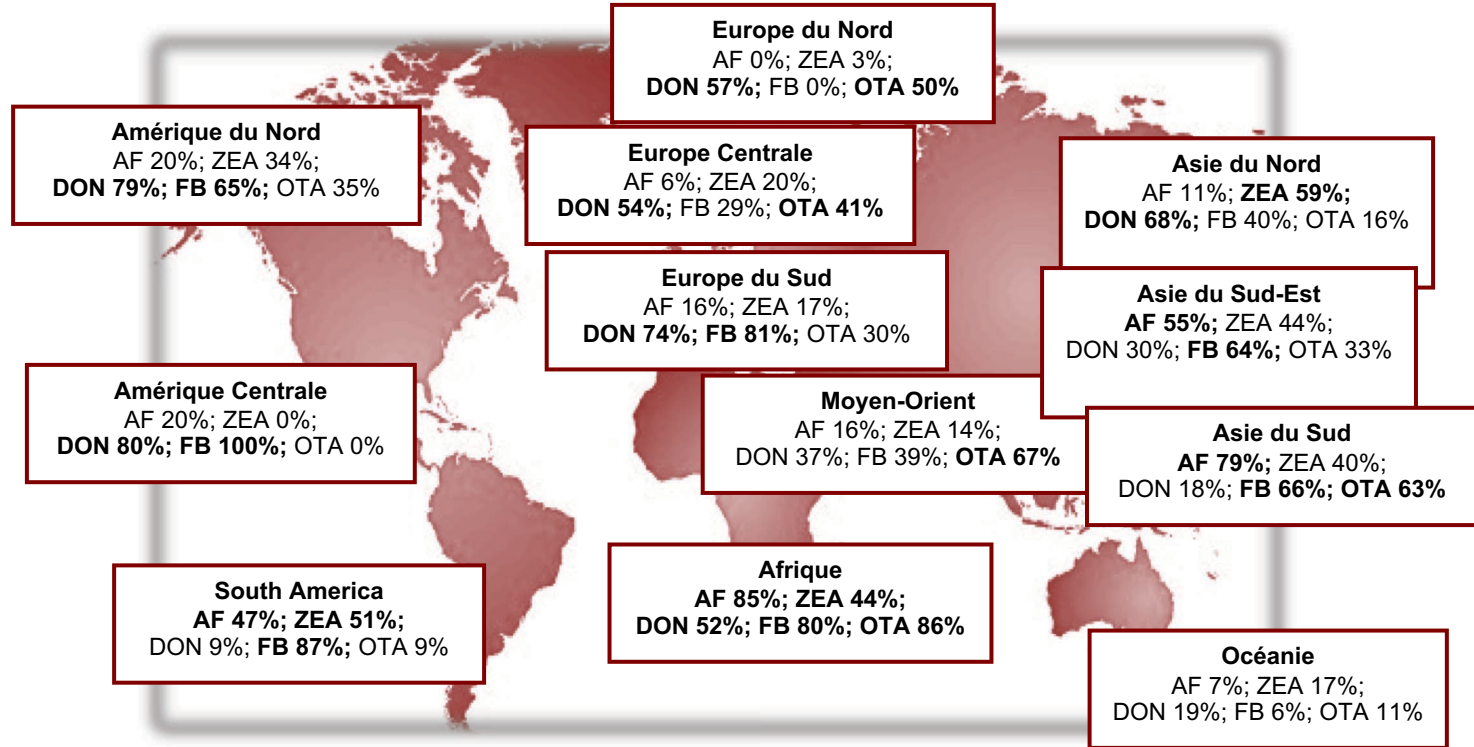


**Fumonisine B1**



**Zearalenone**

# Les mycotoxines : un problème mondial



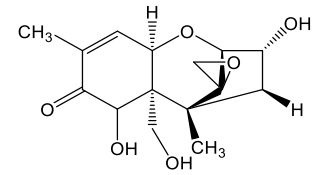
70 % des denrées sont contaminées

# Les mycotoxines : un problème d'actualité dans tous les pays

- Les enquêtes mondiales indiquent que **70% de la production mondiale est contaminée** par les mycotoxines (Schatzmayr et Streit, 2013)
- Dans les pays développés, **les niveaux de mycotoxines peuvent dépasser les valeurs toxicologiques de référence** (deuxième étude alimentation totale, Sirot *et al.*, 2013)
- En 2014, les niveaux élevés de mycotoxines ont conduit les autorités **françaises** à demander pour le maïs une **dérogation temporaire à la limite maximale** (EFSA J, 2014)
- Le climat influence les niveaux de mycotoxines. Quels sont les **conséquences du réchauffement climatique**



# Le déoxynivalénol (DON)



## Origine

Principale mycotoxine produite par *Fusarium graminearum* et *F. culmorum*.

Appartient à la famille des trichothécènes (Type B)

Contamine l'alimentation humaine et animale au travers du maïs et du blé.

## Métabolisme

Absorption rapide, éliminé sous forme conjuguée

## Toxicité

- chez la souris : diminution de la prise alimentaire  
stimulation ou inhibition des fonctions immunitaires
- chez le porc: diminution de la prise alimentaire, refus alimentaire  
vomissements, altération de la réponse immunitaire

## Mécanisme d'action

- interférence avec la peptidyltransferase et diminution de la synthèse d'ADN, d'ARN et des protéines
- action également sur le système nerveux

# Comment analyser les mélanges



# Analyse de la toxicité des mélanges

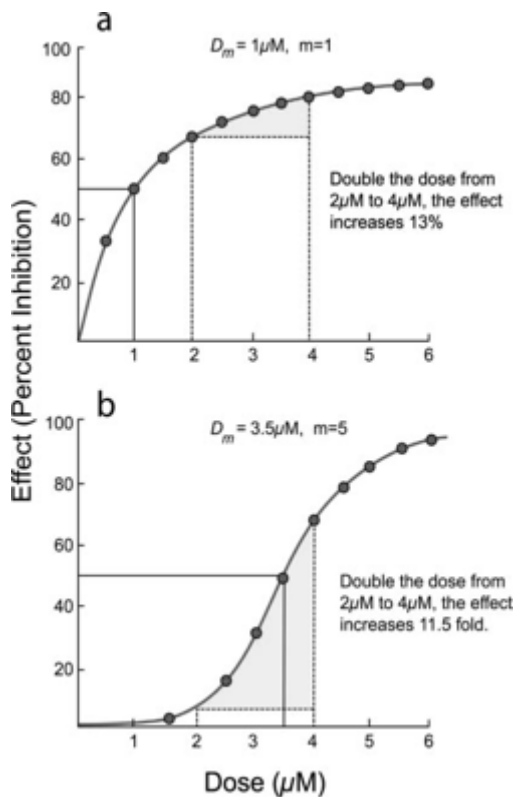
Effets du contaminant **A** + Effets du contaminant **B**



Effets du mélange (contaminant **A** + contaminant **B**)

- < Synergie
- Additivité
- > Antagonisme

# Plans expérimentaux pour analyser la toxicité des mélanges



- Une approche en deux étapes est recommandée
- D'abord une analyse dose-effet de chaque toxique afin de prédire des effets des mélanges “non- interactifs”.
- Ensuite, une comparaison des données expérimentales et des données prédites afin de conclure sur le type d'interaction : effet additif (pas d'interaction), synergique ou antagoniste.

**De nombreuses études portant sur l'interaction des mycotoxines sont difficiles à interpréter, en raison du manque d'expériences dose-réponse.**

# Importance de l'analyse dose reponse : un exemple

Toxicité		Mycotoxine A	Mycotoxine B	Mixture
Effet cytotoxique	Mesuré	$30 \pm 4$	$30 \pm 4$	$40 \pm 5$
	Théorique	-	-	$60 \pm 8$

Valeur mesurée (40) < Valeur théorique (60)

Conclusion : **Antagonisme** entre les mycotoxines A and B

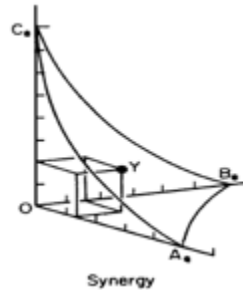
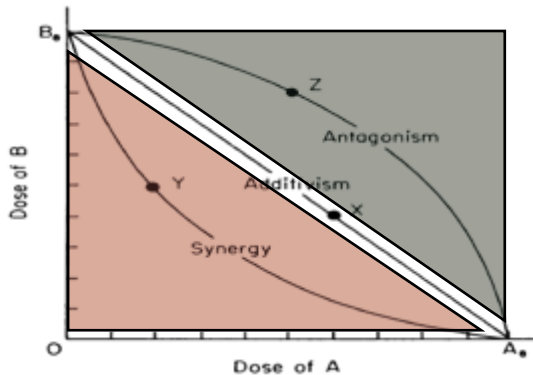
Toxicité		FB1 (1 $\mu$ M)	FB1 (1 $\mu$ M)	Mixture
Effet cytotoxique	Mesuré	$30 \pm 4$	$30 \pm 4$	$40 \pm 5$
	Théorique	-	-	$60 \pm 8$

Pas d'**Antagonisme** entre les mycotoxines A and B, **un simple effet dose**

# Les isobogrammes et les index de combinaison

Principe: (i) déterminer les concentrations de toxines, seules ou en mélange, nécessaires pour avoir un effet donné et (ii) comparer ces concentrations avec celles qui donnerait un effet additif.

Approche graphique : Isobogramme



Approche mathématique : index de combinaison

$$^{n}(CI)_x = \sum_{j=1}^n (D)_j / (D_x)_j = \frac{(D_x)_{1-n} \{ [D]_j \sum_{j=1}^n [D] \}}{(D_m)_j \{ (fax)_j / [1 - (fax)_j] \}^{1/m}}$$

Index de combinaison	Type d'interaction
Inferieur à 0.9	Synergie
0.90 – 1.10	Additivité
Supérieur à 1.10	Antagonisme

Détermination du type d'interaction & de son amplitude

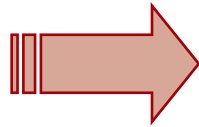
# Toxicité des mélanges de mycotoxines : analyse des interactions



Projet ANR DON & Co (2011-14)  
Coord. F. Forget-Richard, MycSa

# Les co-contaminations entre mycotoxines, une réalité

- Les champignons produisent plusieurs mycotoxines simultanément
- Les aliments peuvent être contaminés par plusieurs champignons
- Les rations sont composées de plusieurs matières premières



La co-contamination par plusieurs mycotoxines  
est la REGLE, pas l'exception

La plupart des études ont analysé les effets des mycotoxines présentes individuellement

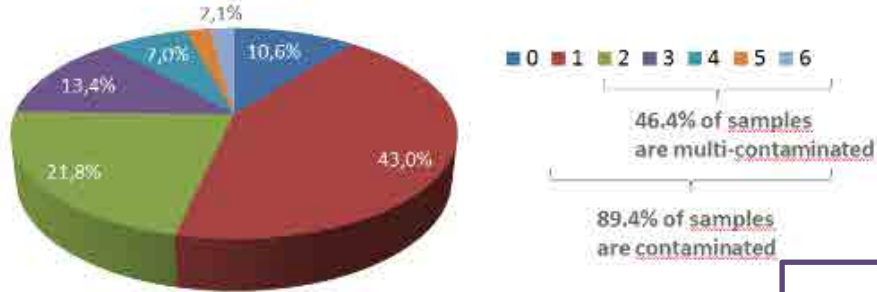
**Il est important d'étudier les effets des co-contaminations et de les prendre en compte par la réglementation**



# La multicontamination par des mycotoxines est un évènement fréquent

Blé (142 échantillons/Europe)

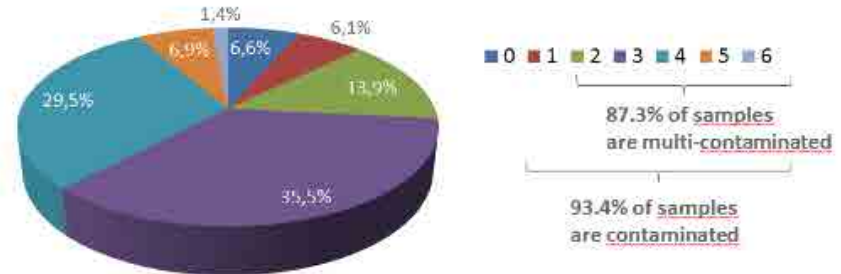
number of groups of mycotoxins



Average number of groups of mycotoxins: 2.0

Maïs (345 échantillons/Europe)

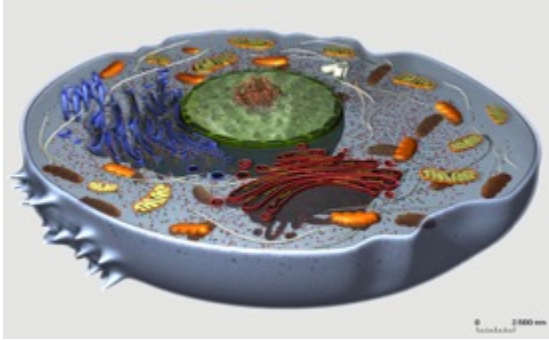
number of groups of mycotoxins



Average number of groups of mycotoxins: 3.2

Données Pancosma, 2015

# Interaction entre le deoxynivalenol et d'autres trichothecenes: études sur cellules



**Proliferating intestinal epithelial cells**



**48 hours-exposure to graded levels of toxin**

- DON, 3-ADON, 15-ADON, NIV : 0 – 7 $\mu$ M
- FX 0 – 0.12 $\mu$ M



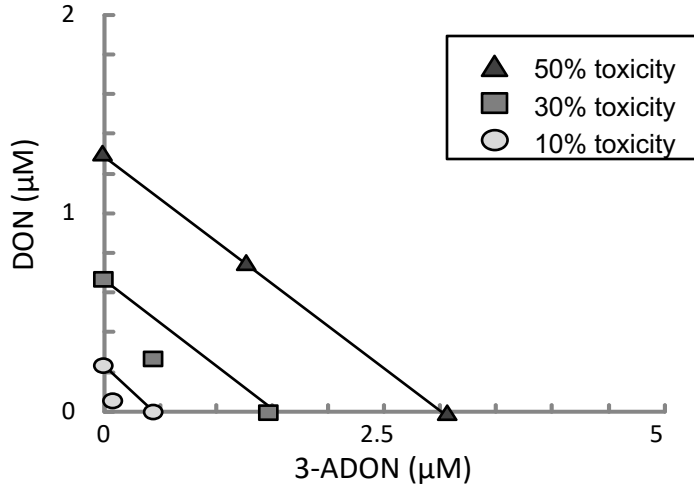
**Cytotoxicity assays**

(MTT test, mitochondrial activity)

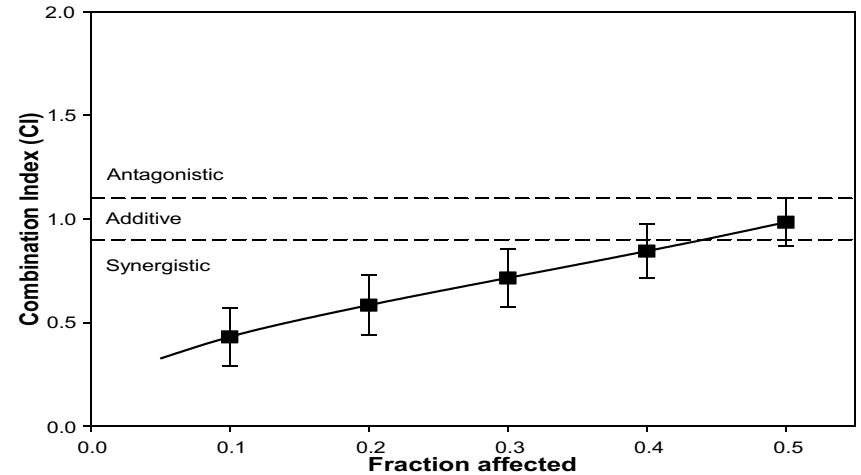


# Effet combiné du DON et du 3-acetyl DON

Approche graphique: Isobologramme

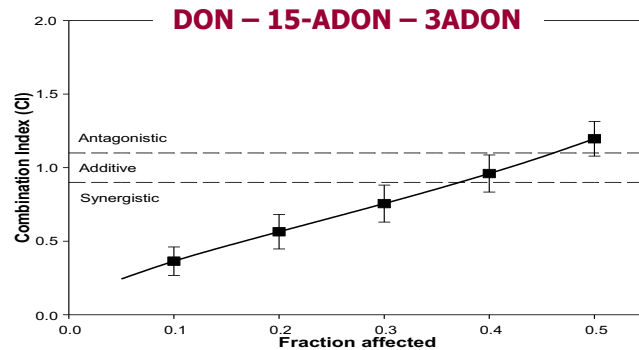
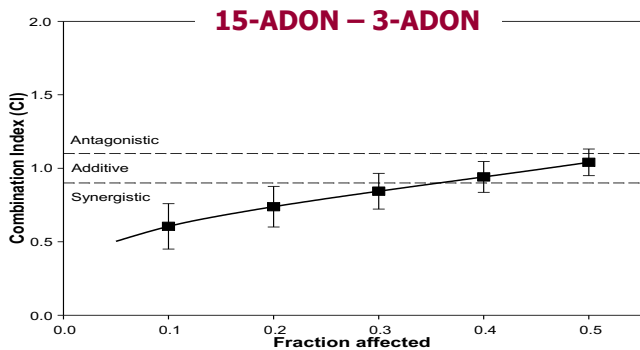
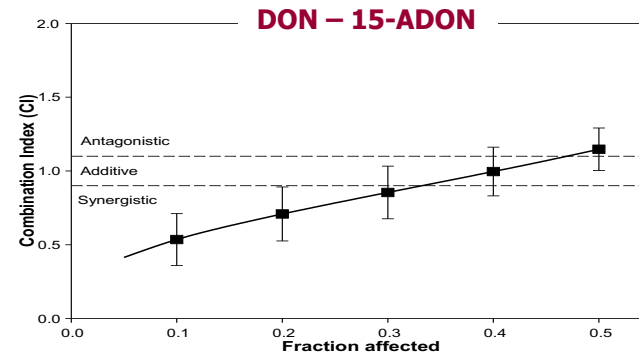
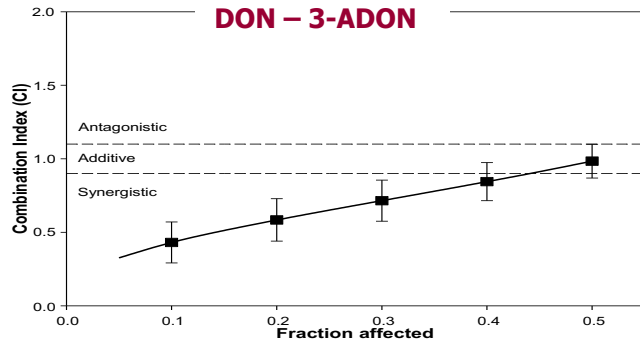



Approche mathématique: index de combinaison



***Le type d'interaction dépend de la dose.  
A faible doses on observe une synergie***

# Effet combiné des trichothecenes de type B



- 
- The type of interaction changes with the concentration
  - At low concentrations, a synergy is observed

# Amplitude de la synergie

**DRI (dose reduction index):** ratio entre les concentrations de toxines utilisées seules et en mélange pour atteindre le même niveau de toxicité.

# Amplitude de la synergie

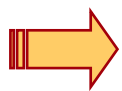
Mycotoxin	Ratio	10% cytotoxicity		30% cytotoxicity	
		CI	DRI	CI	DRI
DON	1:1	0.54	4.2	0.85	2.5
15-ADON			3.4		2.2

➔ Comparée aux mycotoxines prises individuellement, la toxicité des mélanges peut être obtenue à des doses 10 fois plus faibles

# Toxicité combinée des mycotoxines

## Analyse de la cytotoxicité entre les trichothécènes

Mycotoxines	Type d'interaction à faible dose	
	Cellules humaines (Caco-2)	Cellules porcines (Ipec-1)
DON & 3-ADON	Synergie	Antagonisme
DON & 15-ADON	Synergie	Synergie
15-ADON & 3-ADON	Synergie	Synergie
DON & NIV	Synergie	Synergie
DON & FX	Synergie	Antagonisme
NIV & FX	Additivité	Additivité



Aux faibles concentrations, la synergie est le principal type d'interaction entre les mycotoxines

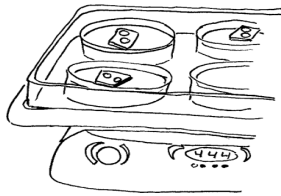
# Interaction entre le deoxynivalenol et d'autres trichothecenes: études sur explants intestinaux



↓ Pig jejunum



↓ Explants



Porcine intestinal explants



4 hours-exposure to graded levels of DON & NIV



Analysis of the expression of cytokines (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-17a, IL-22) by qPCR

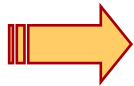


# Toxicité combinée des mycotoxines

## Analyse de la réponse inflammatoire entre DON et NIV

Cytokine	Interaction à faible doses	
	Type	Amplitude (DRI)
<i>IL-1<math>\alpha</math></i>	Synergie	3.58
<i>IL-1<math>\beta</math></i>	Synergie	15.06
<i>IL-8</i>	Synergie	22.6
<i>IL-17A</i>	Synergie	7.75
<i>IL-22</i>	Synergie	15.27

*DRI (dose reduction index): ratio entre les concentrations de mycotoxines seules ou en mélange pour atteindre le même niveau de toxicité.*



La synergie est le principal type d'interaction observé entre le DON et le NIV pour les effets inflammatoires

# Toxicité des mélanges de mycotoxines – métaux : analyse des interactions



Projet ANR CaDON (2015-19)  
Coord. F. Forget-Richard, MycSa

# Co-contamination mycotoxine/élément trace métallique

## Exemple du blé dur

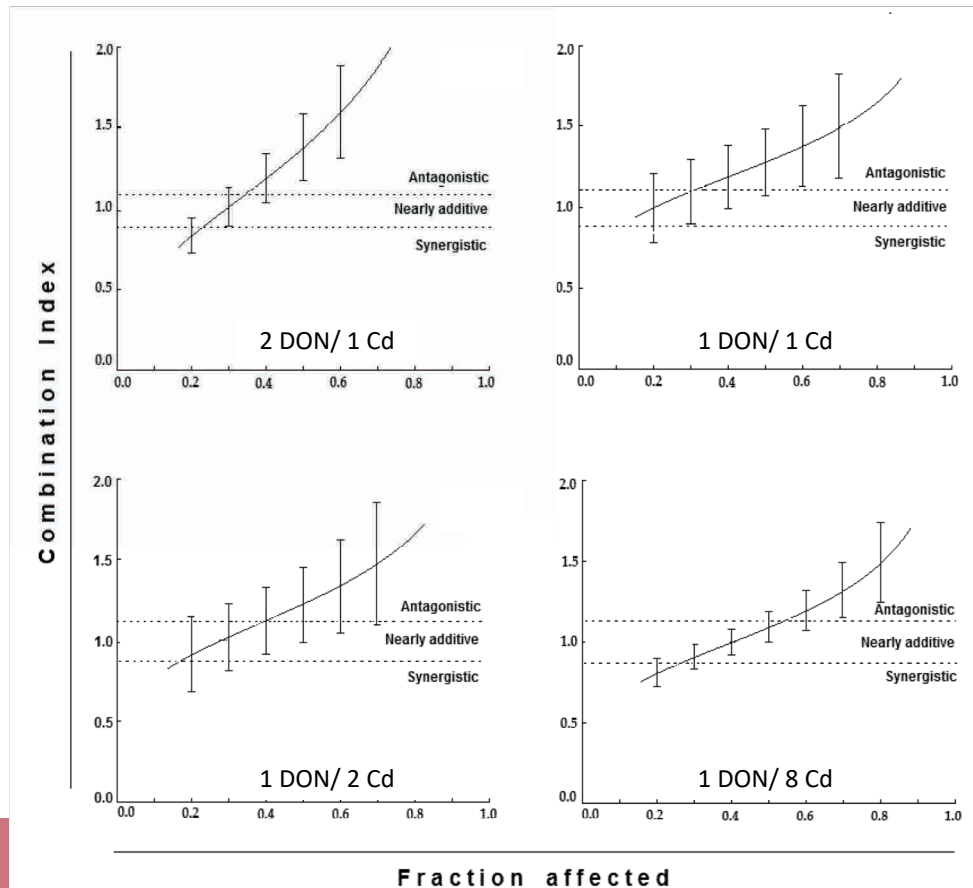
- Le blé dur est une des espèces céréalières les plus sensibles à la fusariose et contamination en DON : dans le cas d'années climatiques à risque, Le DON peut être retrouvé à une concentration supérieure au seuil réglementaire Européen (1750 µg/Kg) dans plus de 10% de la récolte française de blé dur.
- Le blé dur est une des espèces céréalières les plus sensibles à l'accumulation de Cd dans les grains: plus de 30 % des récoltes de blé dur récoltées entre 2011 et 2013 contenaient plus de 0,1 mg/kg de Cd (seuil réglementaire Europe: 0,2 mg/kg).
- **30 % des blés durs récoltés entre 2011 et 2013 en France étaient co-contaminés par DON et Cd.**

Données issues des enquêtes Arvalis/France Agrimer sur la qualité sanitaire des céréales en France  
*NB: ces données sont en cours d'actualisation dans le cadre du projet ANR CaDON*

# Interaction entre la mycotoxine DON et le Cadmium dans les cellules intestinales humaines

- DON: absorption importante, élimination rapide
- Cd: absorption faible, accumulation dans les tissus
- Différents ratio pour mimer les différents types de contamination (aigüe... chronique)

Même type d'interaction entre DON et Cd quelque soit le ratio



# Interaction entre la mycotoxine DON et le Cadmium dans différentes cellules humaines

Le et al., 2017

Fa	Type cellulaire				
	Rein HEK-293	Intestin Caco-2	Sang HL-60	Foie HepG2	
0.2	1.51 ± 0.04	0.98 ± 0.28	0.43 ± 0.04	3.80 ± 1.07	Fort antagonisme
0.3	1.27 ± 0.11	1.13 ± 0.22	0.65 ± 0.04	1.73 ± 0.02	Antagonisme
0.4	1.18 ± 0.08	1.28 ± 0.18	0.94 ± 0.03	1.17 ± 0.06	Antagonisme modéré
0.5	1.12 ± 0.07	1.45 ± 0.15	1.33 ± 0.04	0.95 ± 0.04	Antagonisme faible
0.6	1.07 ± 0.06	1.64 ± 0.19	1.87 ± 0.08	0.82 ± 0.05	Additivité
0.7	1.02 ± 0.06	1.90 ± 0.33	2.73 ± 0.17	0.72 ± 0.05	Synergie modéré
0.8	0.98 ± 0.04	2.30 ± 0.61	4.32 ± 0.39	0.64 ± 0.05	Synergie



L'interaction entre le DON et le Cd varie selon les types cellulaires

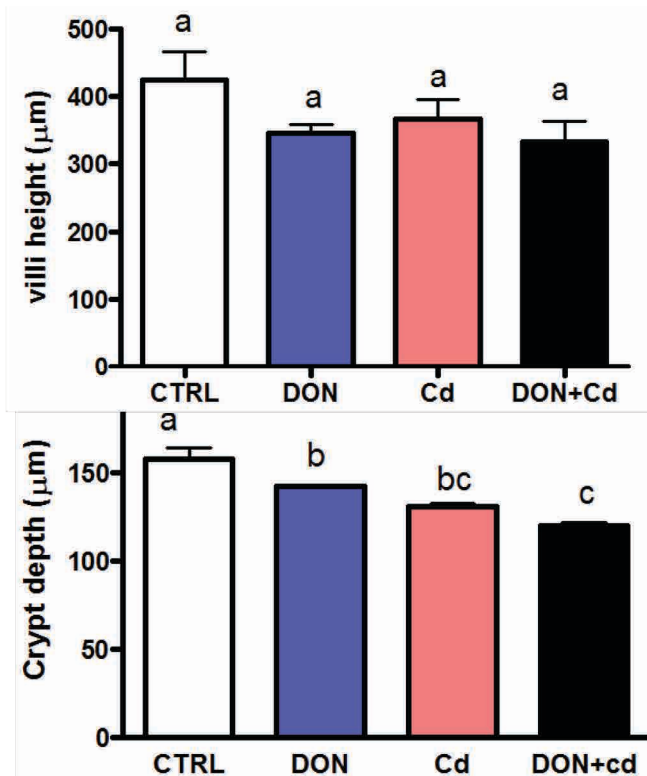
# Interaction entre la mycotoxine DON et le Cadmium chez le rat: morphologie intestinale

Rats nourris pendant 28 jours avec différents régimes

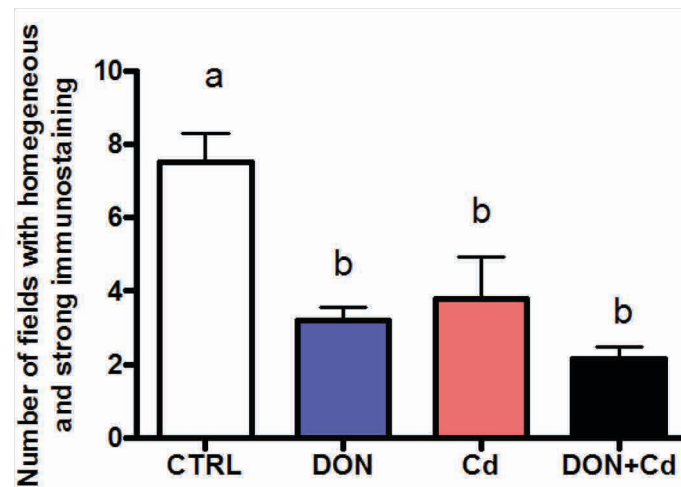
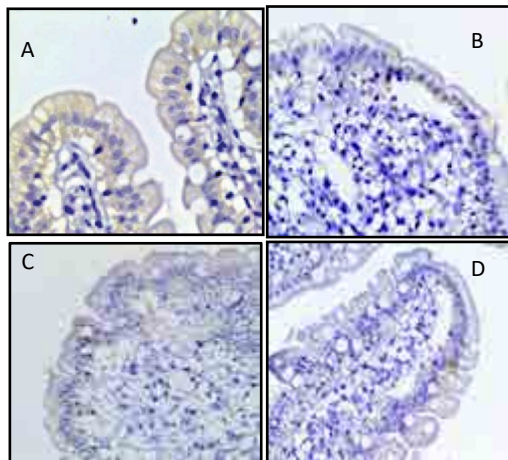
- Contrôle
- DON (nourriture contaminée à 10mg/kg)
- Cadmium (eau de boisson à 5mg/L)
- DON + Cadmium
- 

Analyse au niveau intestinal

- Morphologie
- Protéines de jonction



# Interaction entre la mycotoxine DON et le Cadmium chez le rat: e-cadherine



- Le DON, le Cd et le mélange DON+Cd diminue l'expression des protéines de jonction
- Impossible de caractériser l'interaction car pas d'effet dose

# A retenir (1)

- Les contaminants naturels sont fréquents et difficiles voir impossibles à éliminer
- Ces contaminants sont très souvent présent en mélange
- L'analyse des interactions entre contaminants, nécessite une réponse dose-effet pour les composés individuels et les mélanges.



# A retenir (2)

- Les mycotoxines interagissent entre elles

Pour les mycotoxines de type trichothécènes, le principal type d'interaction observé à faibles concentrations, est une synergie.

- Les mycotoxines interagissent avec les éléments trace métallique

L'interaction entre la mycotoxine DON et le Cadmium est organe spécifique.

- Cette synergie peut constituer un problème pour la santé publique, en particulier lorsqu'elle est observée à faible dose

# NOUVEAUX CHALLENGES

- Nécessité de prendre en compte les différents auxquels nous sommes exposés (notion d'exposome)
- Nécessite d'extrapoler de l'*in vitro* à l'*in vivo* pour analyser les interactions entre les contaminants (le modèle explant peut être une alternative)
- La toxicité des mélanges reste un problème complexe
- La législation doit évoluer et prendre en compte les co-contaminations



MERCI POUR VOTRE ATTENTION



Carrefours de l'innovation  
agronomique

