



Carrefours de l'innovation
agronomique



Contaminants alimentaires : approches émergentes pour connaître et prévenir le risque

Projet Euromix. Vers une démarche normalisée, à l'échelle européenne, pour évaluer les risques des mélanges de contaminants chimiques

Georges de Sousa, INRA



Alimentation Humaine
&
Santé Animale

19 décembre 2018 | APCA, Avenue George V | PARIS

Positionnement du Projet Euromix:

Évaluation réglementaire des mélanges chimiques : Exigences actuelles approches et perspectives d'avenir

- Le nombre de produits chimiques et de combinaisons de produits chimiques auxquels l'homme et l'environnement sont exposés en permanence est potentiellement énorme,
- Il n'est donc ni réaliste ni utile de tester toutes les combinaisons possibles
- Toutefois, l'évaluation des risques pour l'homme (HRA) et l'évaluation des risques pour l'environnement (ERA) des produits chimiques se concentrent principalement sur l'exposition à des produits chimiques individuels, en ne considérant qu'une seule source.



Positionnement du Projet Euromix:

Problèmes à résoudre: évaluer le risque pour l'Homme

- Directives Eu : grouper les pesticides selon leur cible
- Différences dans les législations
- Réduction des expérimentations animales
- Exposition agrégée et combinée
- Comment tester les effets mélanges



Carrefours de l'innovation
agronomique



19 décembre 2018
APCA | Avenue George V | PA RIS

Objectifs spécifiques:

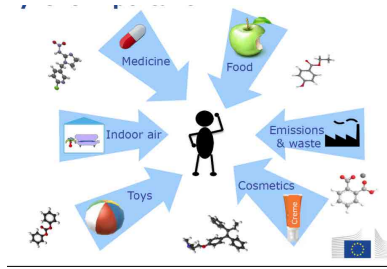
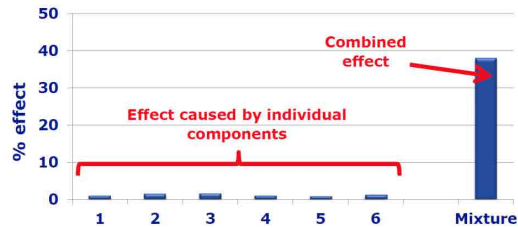
- Définir des approches in silico pour grouper les contaminants
- Etablir des méthodologies permettant la priorisation des contaminants et leurs mélanges
- Développer/valider des essais in vitro
- Etude de cas (BPA, BPF BPS) population
- Valider ce concept sur un étude in vivo
- Création d'une plateforme (ToolBox)



Développer un outil pour l'évaluation du risque pour les mélanges
Stratégie et guidance pour l'évaluation du risque pour les mélanges



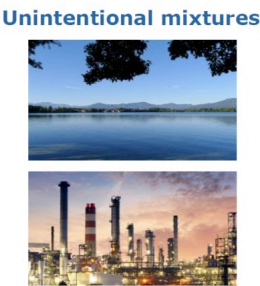
Nécessité de développer des méthodes permettant :



Priorisation : alimentation,
danger population
fenêtre d'exposition



*Les études existantes indiquent que des interaction n'ont pas lieu, soit qu'elles sont peu pertinentes aux doses au niveau ou en dessous de la NOAEL**



Composé avec peu de données et/ou sans tests animal:

- Modélisation : QSAR
- Puissance de l'effet PoDs (CAG)
- Probabilité pour une AOP
- Incertitude :données d'exposition manquantes, déviation dose addition



STRATEGIES ET OUTILS:

Chemin de l'effet adverse:

- Stéatose hépatique
- Malformation du squelette cranio-facial
- Reproduction : Effet estrogénique et antiandrogénique

Trois groupes de composés:

- Pesticides
- Food additives
- Contaminants environnementaux



- Données manquantes (extrapolation)
- Danger:
 - AOP
 - Grouper les pdts chimiques (CAG)
 - Données : danger
 - Cinétique
- Exposition:
 - Exposition : modélisation probabilistique
 - Données réelles
 - Identification des mélanges
- Modèle de dose addition pour les composés ayant une toxicité similaire (RPF)
- Comparaison similaire/dissimilaire

Cumulative Assessment Groups (CAGs): Foie (EFSA, 1/15 organes)*

Pour les pesticides : comment les grouper pour l'évaluation cumulée du risque

Assomption: pesticides produisant le même effet sur le même organe peuvent agir en combinaison

CAG 1: concerne l'Organe cible >200 ; effet hépatique (inclus système biliaire et vésicule)

CAG 2s: classement selon les effets phénotypiques (exemple sur 22 sous GAGs) 134 pesticides

CAG 2A	Hypertrophy (99)	CAG 2E	Hepatocellular neoplasm (35)
CAG 2B	Cell death/degeneration (33)	CAG 2F	Effect on pigment (23)
CAG 2C	Cholestase (58)	CAG 2G	Foci alteration (20)
CAG 2D	<u>Fatty Change</u> (40)	CAG 2H	Hyperplasie bile (18)

CAGs Affinés: (noir QSAR/molecular docking)

CAG 3: Appartenance au même MoA/AoP (cellular level)

CAG 4 : Mécanisme d'action (molecular level)

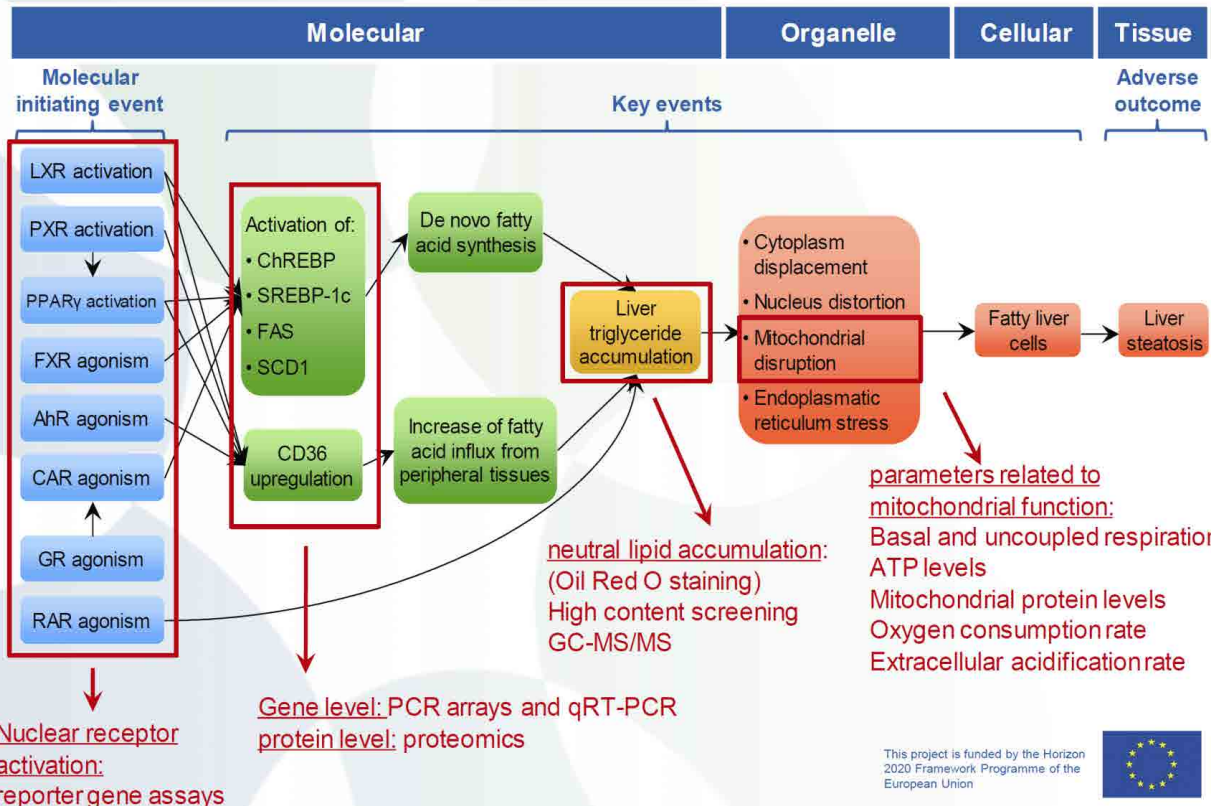
Data Gap : Données manquantes, non testé chez l'animal



Critère de regroupements des composés/Toxicité commune: STEATOSE

Question posées

- Impossible de tester toutes les combinaisons
- Pas raisonnable de tester des composés qui n'interagisse pas (toxicité commune) AOP
- Les effets sur les MIEs et Kes peuvent ils se cumuler aux doses d'exposition?
- Composé causant le même AO mais par différents MIE ou KE
- Dose addition



Selection of compounds for mixture experiments



Aim: Identify mixtures for *in-vitro* and *in-vivo* testing

List of relevant mixtures
(WP2/WP5)
based on hazard and exposure

Select 3 compounds (A, B, C)

- A, B: similar MoA
- C: dissimilar MoA to A and B

Tentative information
about MoA:
ToxCast Database
Literature

In-vitro mixture testing
binary, ternary combinations

In-vivo mixture testing
binary, ternary combinations

PB-PK
modelling

confirmation

Inra Steatose
WP 3

Inra métabolisme WP4

This project is funded by the Horizon
2020 Programme



Carrefour de l'innovation
agronomique



WP5 mixtures (...from exposure data)



Table 2: CAG: Steatosis, Chronic, RPTs: Adults (Subpopulation: with MCR)

French : 156 Individuals		Netherlands : 109 Individuals		UK : 280 Individuals		Greece: 84 Individuals		Czech Republic: 1666 Individuals	
Variance : 66.2%		Variance: 64.8%		Variance : 70.7%		Variance: 66.2%		Variance: 59.6%	
Name	SNMU weight	Name	SNMU weight	Name	SNMU weight	Name	SNMU weight	Name	SNMU weight
Carbendazim and benomyl (RD)	21%	Carbendazim and benomyl (RD)	24%	Carbendazim and benomyl (RD)	19%	Permethrin	24%	Carbendazim and benomyl (RD)	21%
Thiacloprid	16%	Cypermethrin (RD)	18%	Thiacloprid	15%	Carbendazim and benomyl (RD)	22%	Deltamethrin (RD)	10%
Imazalil	10%	Imazalil	15%	Imazalil	14%	Cypermethrin (RD)	13%	Imazalil	9%
Cypermethrin (RD)	9%	Deltamethrin (RD)	8%	Deltamethrin (RD)	11%	Alfomethrin (RD)	12%	Alfomethrin (RD)	8%
Deltamethrin (RD)	9%	Thiacloprid	5%	Cypermethrin (RD)	11%	Thiacloprid (RD)	6%	Permethrin	7%
Imazalil (RD)	6%	Imazalil	5%	Imazalil (RD)	8%	Imazalil and benomyl (RD)	5%	Thiacloprid	6%

Present in 7 countries
Present in 5-6 countries
Present in 3 countries
Present in 1 country

Tested in vitro

EuroMix Stakeholder Workshop

16-17-2017

This project is funded by the Horizon 2020 Framework Programme of the European Union (ERC)

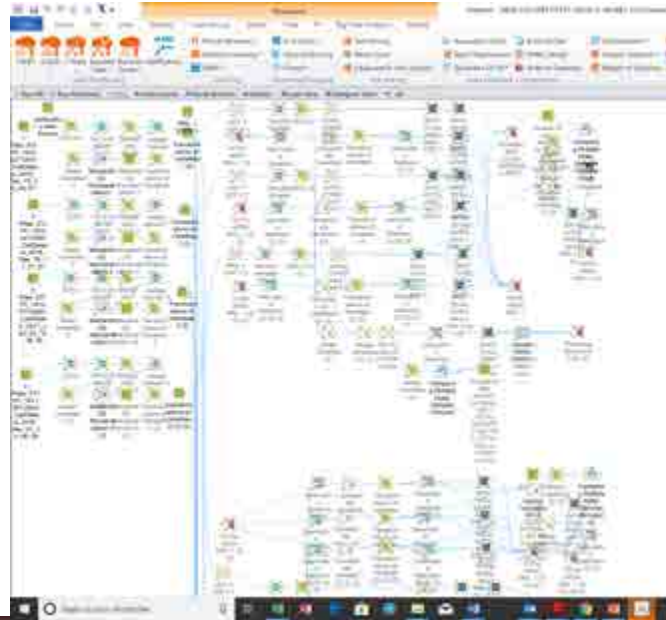
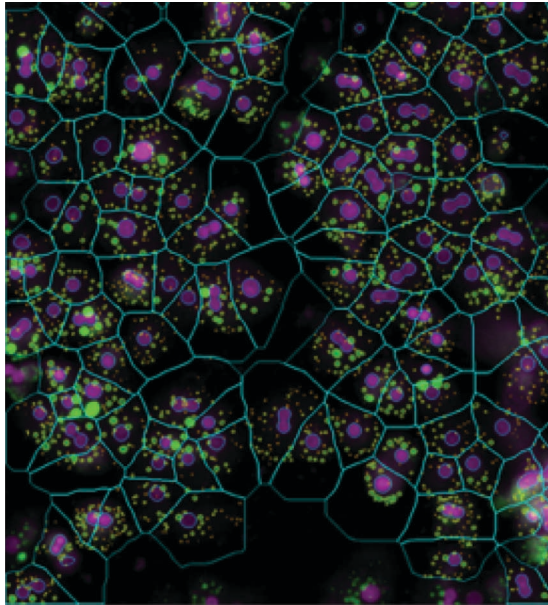


Carrefour de l'Innovation
Agronomique

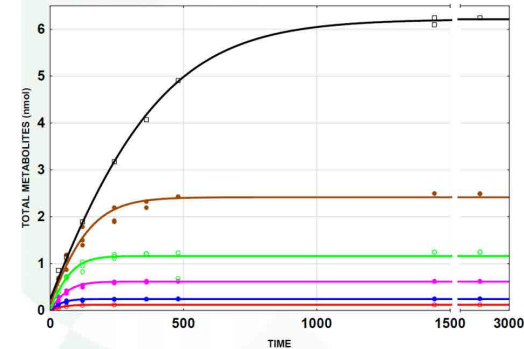
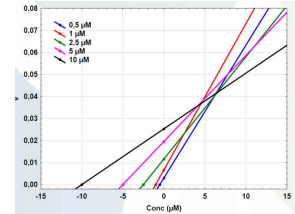


Inra Toxalim : implication dans le projet

- WP3 : AOP Stéatose, phénotype hépatocytaire lignée cellulaire HepaRG et hépatocytes rat et humains, modélisation concentration addition
 - Utilisation technologie émergente : HCS
- WP4: métabolisation (modélisation PB/PK) hépatocytes rat et humains



Linuron



Choix communs pour le WP3 HepaRG

Culture d'hépatocytes
primaires : gold model

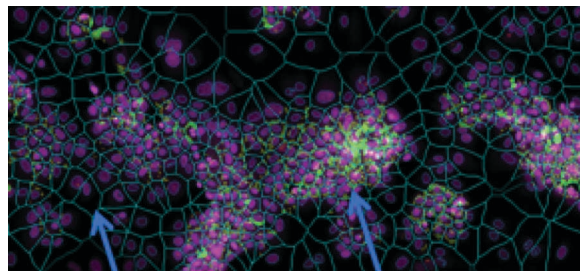
Mais:

- Disponibilité ?
- Reproductibilité ?

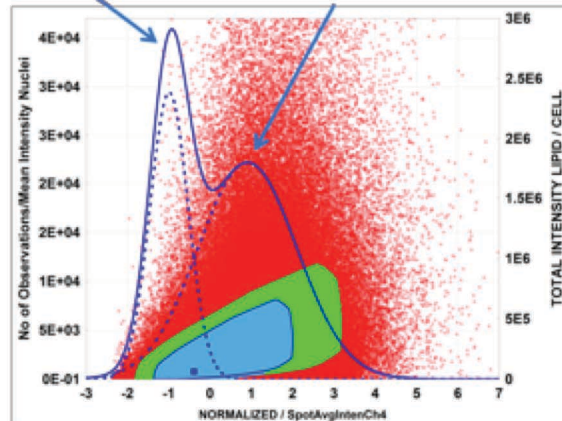
HepaRG

Ligne stable

Transposable pour
l'ensemble des labos



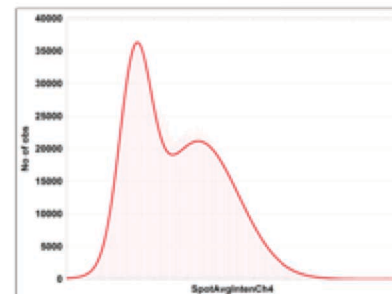
CHOLANGIOCYTES **HEPATOCYTES**
-0.99±0.46 34% 0.91±1.19 66%



DISTINCTION OF HEPATOCYTES AND EPITHELIAL CELLS/

- NORMALIZATION ON THE BASIS OF SPOT AVG INTENSITY (ROBUST STATISTICS) USING « MAD »
- HISTOGRAMME DE DISTRIBUTION

$$MAD = b \cdot M_i(|x_i - M_j(x_j)|)$$



ON THE BASIS OF AVG INTENSITY OF NUCLEI FOLLOW A BIMODAL DISTRIBUTION:

- Verified by : $|m_1 - m_2| > (s_1 + s_2)$
- This bimodal distribution can be simplified as two gaussian distribution giving the proportion of cells.

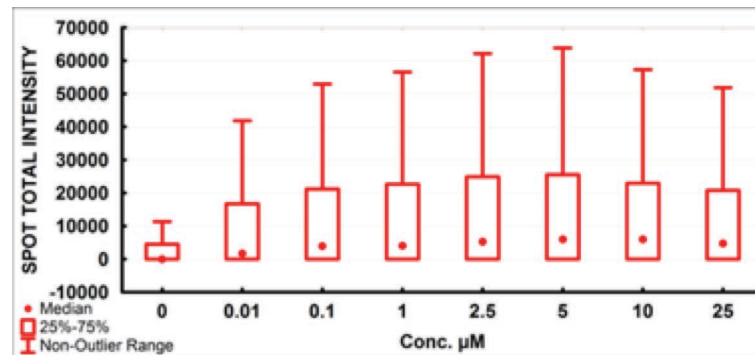
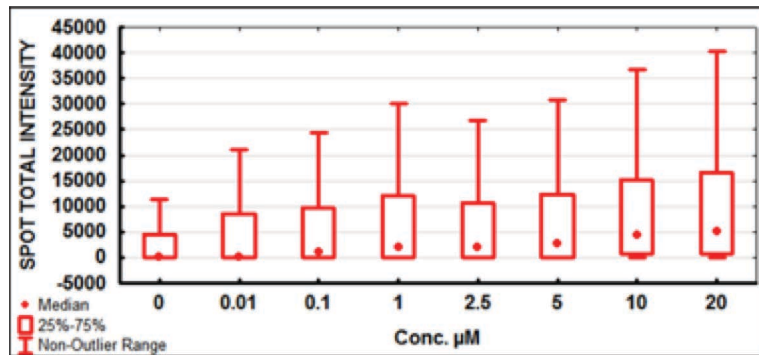
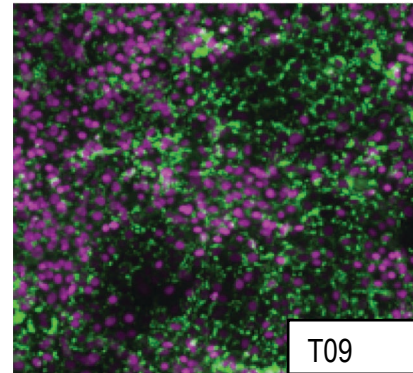
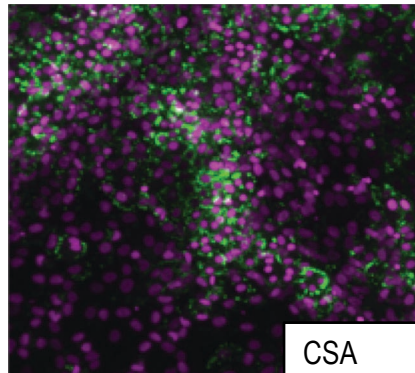
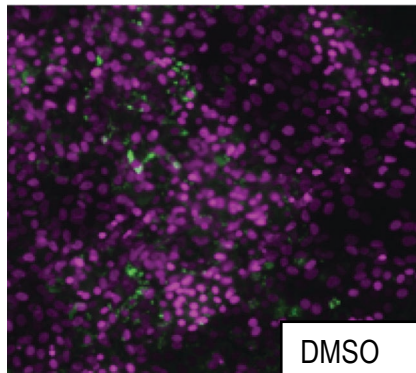
CONCLUSION :

ONLY HEPATOCYTES ACCUMULATES LIPID DROPLET
WHEN USING HYPHONE II FETAL CALF SERUM, LIPID
DROPLETS BASAL LEVEL ARE HIGH



Apport de l'HCS dans le mécanisme d'action

CSA / ACCUMULATION DANS LA ZONE HEPATOCYTAIRE
T09 : ACCUMULATION DANS L'ENSEMBLE DES CELLULES

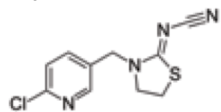


Choix des doses:

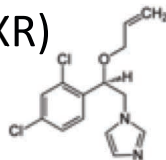
- Benchmark Dose analysis* (RIVM and EPA)
- Régression non-linéaire dose/réponse
- Différent de la NOAEL

Exemples:

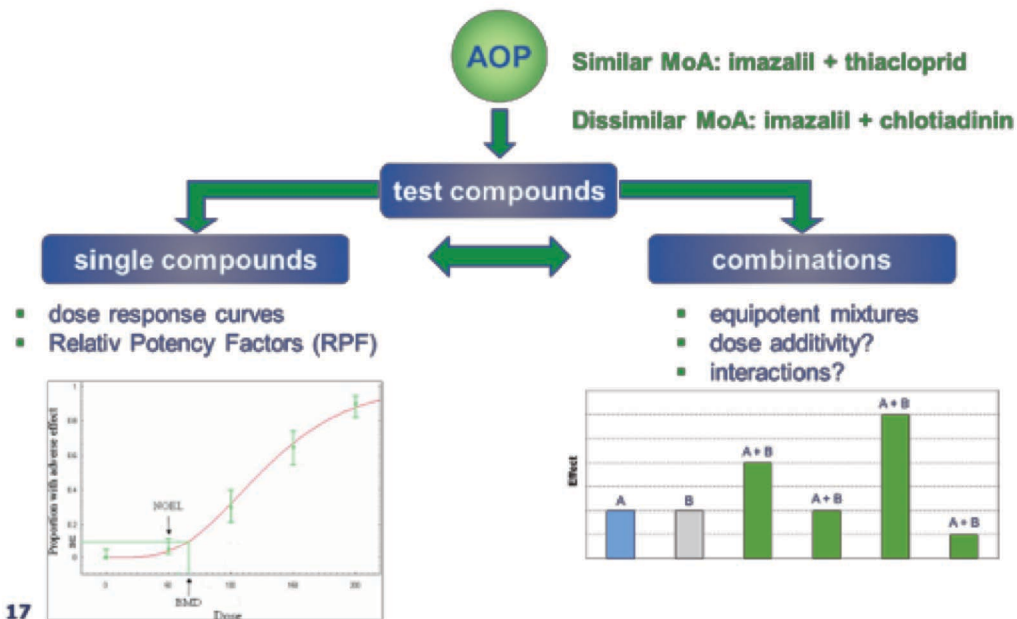
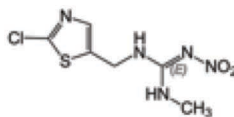
- THIACLOPRIDE (simi : PXR)



- IMAZALIL (simi : PXR)



- CLOTHIANIDIN (dissi: PXR)



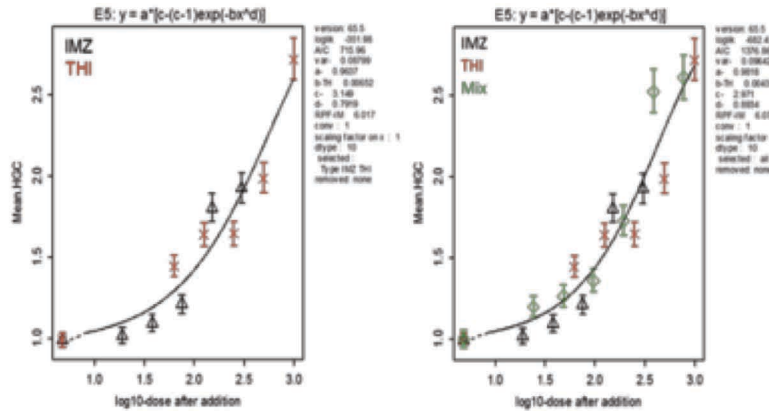
THI (μM)	IMZ (μM)	CTD (μM)
1000	50	1000
500	25	500
250	12.5	250
125	6.25	125
62.5	3.125	62.5

RPF	1	200	25.6
Compound	THI (μM)	FPX (μM)	IMZ (μM)
Mixture 1	15.625	0.08	0.61
Mixture 2	31.25	0.16	1.22
Mixture 3	62.5	0.31	2.44
Mixture 4	125	0.63	4.89
Mixture 5	250	1.25	9.77
Mixture 6	500	2.50	19.55

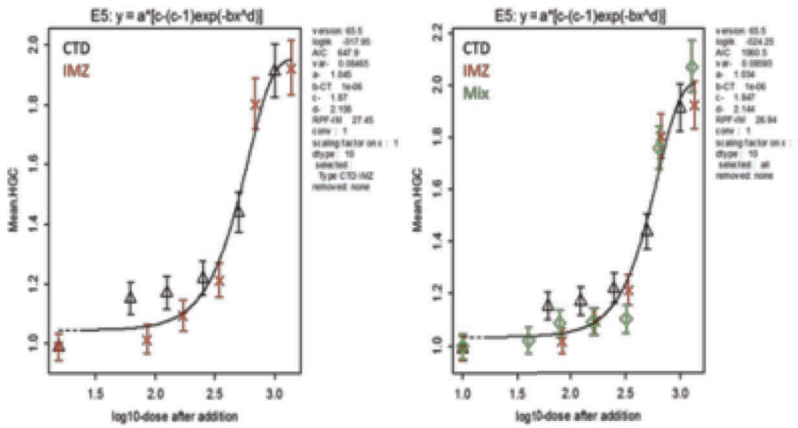


Application du modèle de Dose Addition

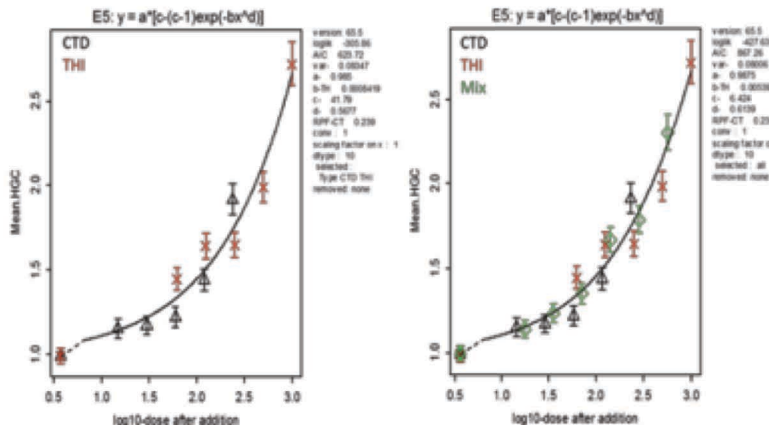
IMZ +THI



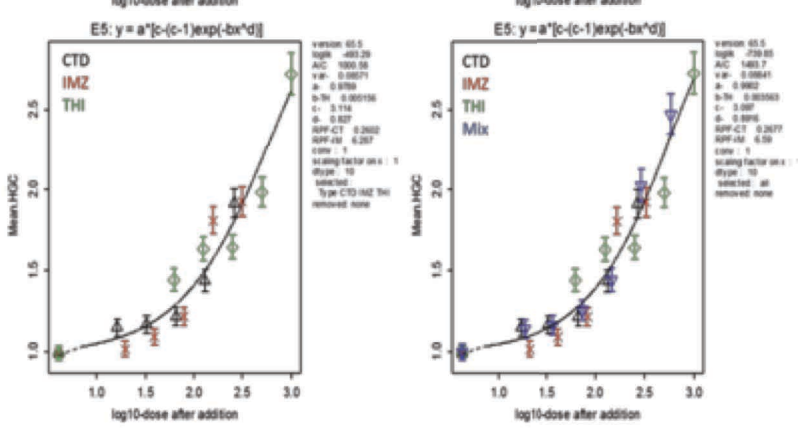
CTD+IMZ



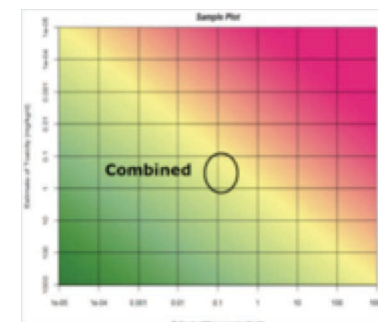
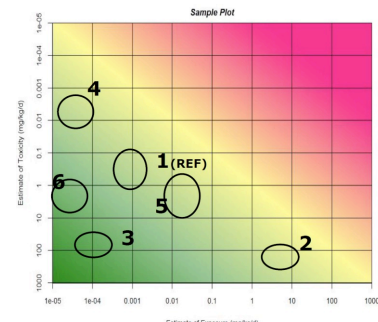
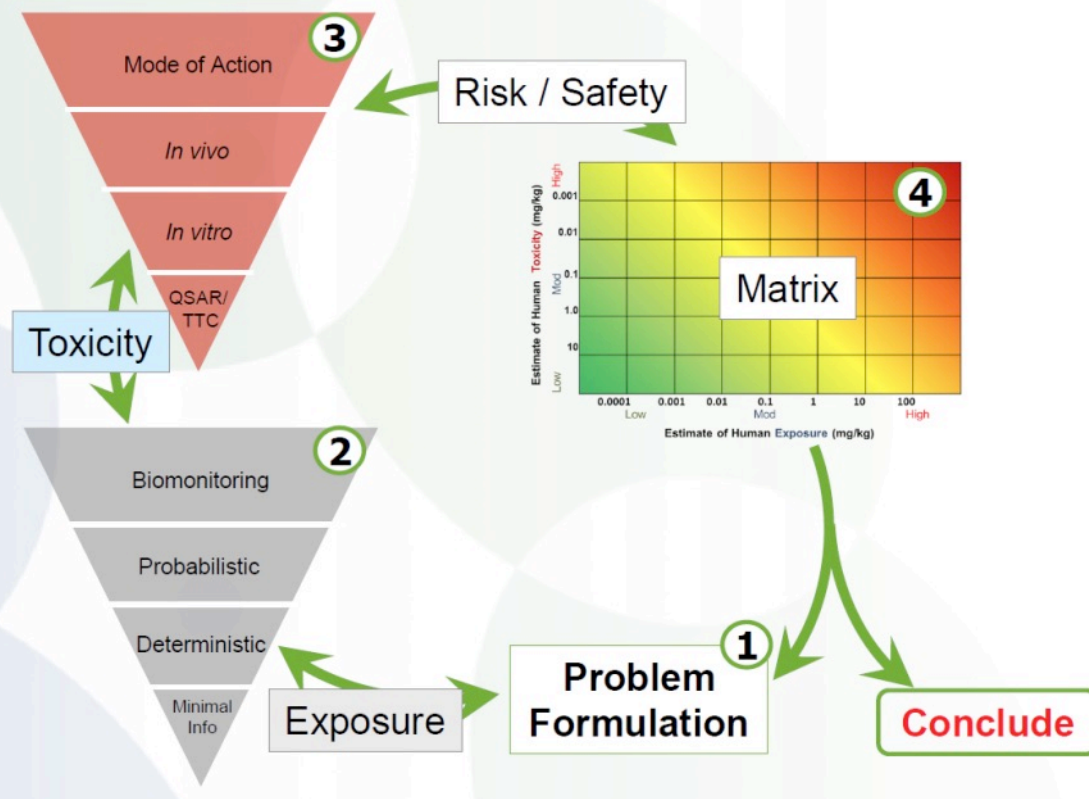
CTD+THI



THI+CTD+IMZ



De l'exposition à la toxicité



CONCLUSIONS / PERSPECTIVES

- PROGRAMMES NATIONAUX (ANR, ANSES) et AUTRES PAYS (NL, D)
- PROGRAMMES EUROPEENS / EDC-MixRisk, EUROMIX, EU-ToxRisk, HBM4EU, SOLUTIONS

L'ensemble de ces recherches a permis la création de collaboration, d'échange de méthode, de données, créant ainsi une synergie dans le domaine de l'évaluation du risque liée à notre exposition aux mélanges de produits chimiques, associés aux experts européens de l'EFSA, JRC, EEA, DGE ainsi que ceux de l'EFSA, WHO cela démontrent de l'implication des acteurs clés pour maximiser l'impact de ces recherches dans le but d'améliorer la sécurité chimique

Néanmoins: pour faire perdurer ces recherches

Prise de position de scientifiques : Position Paper: Preventing risks for people and environment from hazardous chemical mixtures



Conclusions

- Des études épidémiologiques font apparaitre des relations entre contaminants environnementaux et maladies
- L'exposition est ubiquitaire et permanente même sur des produits bannis
- Souvent théorique par exemple les effets de perturbation endocrinienne apparaissent bien en dessous de la NOECs

Considération générale sur l'évaluation du risque

- Les résidus de pesticides sont majoritairement en dessous des MRLs par minimisation de l'exposition aux produits chimiques
- Evaluation pour cumulative assessment
- Est-ce que les co-expositions existent?
- Intoxications aiguës
- Formulations
- Est-ce que les toxicités sont similaires?
- Exposition chronique?

Data-poor compounds:
non-animal tests(data)



- Probability of belonging to a CAG with QSAR/molecular docking
- Distribution of PoDs within a given CAG (estimation of potency)
- Probability of belonging to CAG with *in vitro* data (AOP-based)
- (more uncertainties to be quantified: e.g. missing exposure data, non-detects, deviation from dose-additivity etc.....)

Data-poor compounds:
non-animal tests(data)



- Probability of belonging to a CAG with QSAR/molecular docking
- Distribution of PoDs within a given CAG (estimation of potency)
- Probability of belonging to CAG with *in vitro* data (AOP-based)
- (more uncertainties to be quantified: e.g. missing exposure data, non-detects, deviation from dose-additivity etc.....)

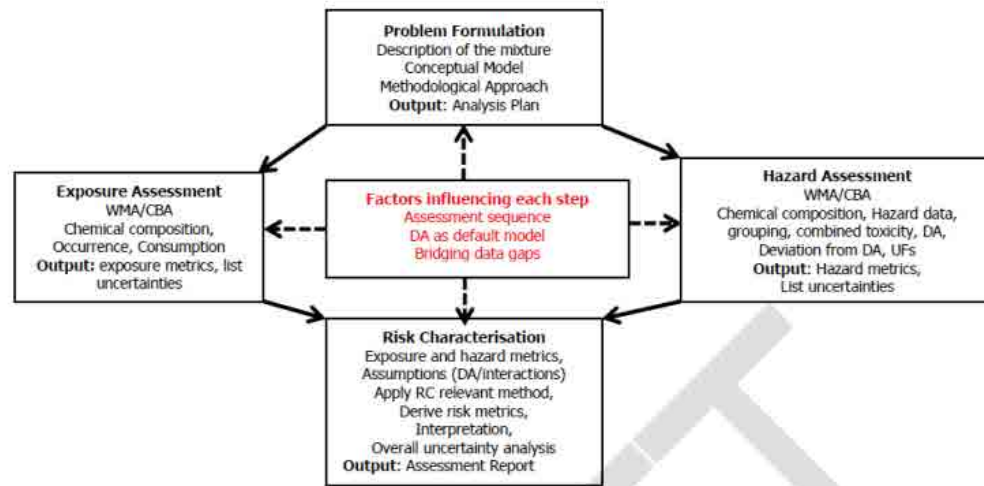
Euromix tool and strategy

Hazard

- Adverse outcome pathway (AOP) networks
- Grouping of chemicals
- Hazard data
- Kinetics

Risk

- Margin of exposure and other approaches



This project is funded by the Horizon
2020 Framework Programme of the
European Union



Carrefours de l'innovation
agronomique

