



**HAL**  
open science

## Exposition alimentaire aux pesticides seuls ou en mélange : caractérisation métabolique et impact sur la barrière intestinale

Métais Benjamin, Edwin Fouché, Anne Lespine, Anne Galinier, Sutra Jean-François, Laurence Gamet-Payrastre

### ► To cite this version:

Métais Benjamin, Edwin Fouché, Anne Lespine, Anne Galinier, Sutra Jean-François, et al.. Exposition alimentaire aux pesticides seuls ou en mélange : caractérisation métabolique et impact sur la barrière intestinale. Innovations Agronomiques, 2013, 28, pp.49-57. 10.17180/f0k6-he23 . hal-04537730

**HAL Id: hal-04537730**

**<https://hal.inrae.fr/hal-04537730>**

Submitted on 8 Apr 2024

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

## Exposition alimentaire aux pesticides seuls ou en mélange : caractérisation métabolique et impact sur la barrière intestinale

Métais B.<sup>1</sup>, Fouche E.<sup>1</sup>, Canlet C.<sup>1</sup>, Ilespina A.<sup>1</sup>, Galinier A.<sup>2</sup>, Sutra J.F.<sup>1</sup>, Gamet-Payraastre L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INRA, UMR 1331, Toxalim, Research Centre in Food Toxicology, Université de Toulouse, INP, ENVT, EIP, UPS, 180 chemin de tournefeuille, 31027 Toulouse, France.

<sup>2</sup>Laboratoire de Biochimie Nutritionnelle "STROMALab", UMR UPS/CNRS/EFS 5273 Inserm U1031 CHU Rangueil, 1 avenue Jean Poulhès, 31059 Toulouse cedex 9

Correspondance : [laurence.payraastre@toulouse.inra.fr](mailto:laurence.payraastre@toulouse.inra.fr)

### Résumé

L'objectif de ce projet était de comparer et caractériser l'impact d'une exposition alimentaire à une faible dose de trois pesticides, seuls ou en mélange. Ces études ont été réalisées *in vivo* chez la souris C57Bl6. Le protocole expérimental chez l'animal a été construit dans l'objectif d'évaluer les effets des pesticides présents dans l'aliment aux doses journalières admissibles (DJA) sur la descendance après une exposition périnatale et après sevrage. Les pesticides choisis sont l'endosulfan, le chlorpyrifos et l'atrazine. Les principaux résultats obtenus *in vivo* montrent que l'exposition aux pesticides seuls depuis le développement fœtal jusqu'à l'âge adulte est associée au niveau plasmatique à une empreinte métabolique spécifique de chaque traitement, qui reflète la perturbation du métabolisme glucidique et du métabolisme lié au statut oxydoréduction. Une modification spécifique de la barrière intestinale mesurée au travers de l'expression des transporteurs membranaires est aussi observée chez les mâles exposés au chlorpyrifos. Ceci peut entraîner des perturbations de la biodisponibilité de ces composés ainsi que de celle d'autres xénobiotiques ou médicaments. *In vivo*, l'effet du mélange ne semble pas prédictible à partir de l'effet des pesticides seuls, quel que soit le paramètre étudié, ce qui laisse supposer qu'il serait important dans les procédures d'évaluation du risque de prendre en considération l'effet des mélanges. En conclusion, nous avons montré dans cette étude que les pesticides présents, même à faible dose, dans l'aliment pouvaient engendrer des perturbations de fonctionnalité des pompes d'efflux des xénobiotiques et de l'équilibre oxydoréducteur chez la souris. De plus, nos résultats montrent que l'approche métabonomique sur le plasma représente un outil potentiel non invasif à envisager pour caractériser l'exposition alimentaire à certains pesticides.

**Mots-clés** : pesticide, mélange, faible dose, exposition alimentaire, biomarqueurs

**Abstract:** Dietary exposure to pesticides either alone or in combination: metabolic characterisation and impact on the intestinal wall

The aim of our project was to compare and characterize the impact of a dietary exposure to a low dose of three pesticides, alone or in combination. These studies were performed *in vivo* on C57BL6 mice. The experimental protocol was built to assess the effects of pesticides present in the food at the acceptable daily intake level (ADI), upon exposure of the offspring from fetal development until adult age (14 weeks old). Tested pesticides were endosulfan, chlorpyrifos and atrazine. The main results show that *in vivo* exposure to individual pesticides from fetal development until adulthood is associated in the plasma with a specific metabolic fingerprint of each treatment, which reflects disturbance of carbohydrate metabolism and oxidative status. A specific modification of the intestinal barrier measured through the expression of membrane transporters is also observed in males exposed to chlorpyrifos which may lead to changes of the bioavailability of pesticides as well as for of other xenobiotics or drugs. *In vivo*, the effect of mixture does not appear to be predictable from the effect of individual pesticide, regardless of the studied parameter, suggesting that it would be important to take into

account the effect of mixtures in risk assessment procedures. In conclusion, in this study we showed that presence of pesticides in food, even at low dose, could cause disruption of efflux pumps of xenobiotics and redox balance in mice. In addition, our results showed that metabonomic analysis of plasma may represent a potential non-invasive tool to characterize dietary exposure to pesticides.

**Keywords:** pesticide, mixture, low doses, dietary exposure

## Introduction

Sous couvert des résultats des études scientifiques sur l'alimentation, différentes organisations mondiales et internationales de la santé (PPNS, OMS) conseillent aux consommateurs de favoriser une alimentation riche en fruits et légumes pour une meilleure santé. Cependant, la consommation de fruits et légumes s'accompagne aussi, comme montrent les résultats des études de diverses agences de sécurité sanitaire des aliments, d'une exposition à différents contaminants et notamment aux pesticides. Un rapport récent de l'EFSA montre par exemple que dans la communauté européenne 49,5 % des fruits et légumes contiennent des pesticides (EFSA, 2010a, 2010b). Les pesticides sont considérés comme des facteurs de risques pour la santé car les études épidémiologiques montrent souvent une corrélation positive entre l'exposition professionnelle à ces composés et le risque d'apparition de certaines pathologies (Mehri et al., 2007 ; Alavanja et Bonner, 2012). L'exposition des utilisateurs de pesticides pourrait aussi avoir des conséquences sur la santé de leurs descendants (Vinson et al., 2011). En effet, l'exposition prénatale du père ou de la mère aux pesticides *via* l'utilisation professionnelle ou ménagère, entraînerait chez l'enfant une augmentation significative du risque de développer des cancers du cerveau, des leucémies ou des lymphomes (Van Maele-Fabry et al., 2011). Par ailleurs, certains auteurs ont montré des corrélations positives entre les taux de métabolites de pesticides dans les fluides biologiques (méconium, urine) de la mère ou de l'enfant et l'apparition de troubles de la santé chez l'enfant (Lafiura et al., 2007).

L'exposition des consommateurs est différente de celle des utilisateurs (voie, dose, chronologie, fréquence). L'évaluation du risque encouru par le professionnel ne peut donc être applicable aux consommateurs. De plus, il est difficile de mettre en évidence une relation de causalité entre pesticides et santé chez le consommateur pour des raisons liées essentiellement à la multiplicité des composés. En effet, le consommateur est exposé *via* l'alimentation à des mélanges de pesticides à faibles doses et à long terme.

Il a été admis pendant longtemps que les composés présents aux doses correspondant à leur NOAEL (*No Observable Adverse Effect Level*) et qui agissent *via* des mécanismes d'action différents, ne pouvaient pas exercer d'effet même lorsque ils étaient présents en mélange (Kortenkamp et Faust, 2010 ; Orton et al., 2012). Cependant, des études expérimentales relatives aux perturbateurs endocriniens et à la fonction de reproduction, montrent que les mélanges (i) peuvent exercer des effets marqueurs de perturbation endocriniennes à des doses inférieures à leur NOAEL, que leur mécanisme d'action soit similaire ou différent, et (ii) que les mélanges peuvent exercer des effets cumulatifs et/ou dépendant de la dose lorsque les composés du mélange ont pour cible un même tissu. Lorsque l'on élargit la littérature à d'autres cibles biologiques, on s'aperçoit qu'il est difficile d'établir une conclusion définitive : une exposition à des mélanges induit des effets hétérogènes suivant le tissu, le paramètre biologique ou la fonction physiologique considéré (Elabbas et al., 2011 ; Desaulniers et al., 2012 ; Hernandez et al., in press).

L'objectif de cette étude était de caractériser en termes de biomarqueurs d'exposition et/ou d'effet, l'exposition alimentaire à de faibles doses de pesticides, seuls ou en mélange.

Nous avons établi un modèle murin d'exposition alimentaire pour l'étude de l'effet combiné de trois pesticides (l'endosulfan, le chlorpyrifos et l'atrazine) par rapport à l'effet de ces pesticides pris

individuellement. Les études ont été focalisées plus spécifiquement sur l'identification de marqueurs biologiques. Le protocole expérimental chez l'animal a été construit dans l'objectif d'évaluer les effets des pesticides sur la descendance après une exposition périnatale et après sevrage. Sur la base des données publiées faisant état des effets biologiques des pesticides, trois principaux marqueurs ou voies métaboliques ont été explorés : (i) le statut oxydoréducteur de l'organisme ; nous avons focalisé l'exploration sur un marqueur du statut redox consensuel, le glutathion, sur le rapport GSH/GSSG et sur les défenses antioxydantes lipidiques (vitamine E et coenzyme Q). Les matrices biologiques explorées sont la moelle osseuse afin de mettre en évidence une implication du stress oxydant dans les cellules hématopoïétiques et le foie ; (ii) les transporteurs d'efflux actifs de la barrière intestinale ; l'objectif était d'explorer l'influence du mélange ou des pesticides isolés sur l'expression de transporteurs actifs la P-gp, les MRPs et BCRP ; (iii) l'homéostasie métabolique (analyse RMN de différents fluides et tissus biologiques) ; cette étude a été réalisée par une analyse RMN (du proton) des métabolites sur des extraits de différents tissus (foie, plasma, cerveau) après traitement avec des pesticides pris isolément ou en mélange, suivie d'une étude statistique permettant la recherche des paramètres discriminants entre les différents groupes traités et non traités.

## 1. Matériel et Méthodes

### 1.1 Expérimentation animale

L'Expérimentation animale a été réalisée sur des souris C57 Black 6. Le mélange de pesticides était composé de 2 insecticides, un organophosphoré (le chlorpyrifos) et un organochloré (l'endosulfan) et d'un herbicide de la famille des triazines (l'atrazine). Les pesticides ont été incorporés dans l'aliment en poudre à des doses calculées à partir de la Dose Journalière Admissible définie chez l'homme (DJA). Cet aliment enrichi en pesticide a ensuite façonné sous forme de croquettes par l'UPAE (unité expérimentale, INRA Jouy-en-Josas). Le contenu en pesticides de chaque lot d'aliments a ensuite été contrôlé par la société EUROFINS. Les souris ont été exposées à une alimentation contaminée, la voie orale permettant en effet d'explorer les effets sur la barrière intestinale.

L'expérimentation s'est déroulée de la façon suivante. Nous disposions de 5 lots d'animaux :

- un lot témoin correspondant à des souris recevant l'aliment contrôle,
- trois lots recevant chacun l'un des trois pesticides,
- un lot recevant le mélange des trois pesticides.

Les mères ont été alimentées avec les régimes contaminés pendant la période de gestation et de lactation. Ensuite la descendance a été alimentée pendant onze semaines avec ces mêmes aliments. À la fin de la période de traitement les animaux ont été sacrifiés et les différents prélèvements effectués de façon à procéder à l'analyse des différents paramètres.

### 1.2 Etude métabonomique

Les perturbations métaboliques ont été suivies au niveau plasmatique chez des souris ayant reçu des pesticides, individuellement ou en mélange, comparativement au groupe de témoins. Cette approche nécessite l'utilisation de la spectrométrie par résonance magnétique nucléaire (RMN) comme technique d'analyse, couplée à des méthodes statistiques multivariées (ACP, Analyse en Composantes Principales, AFD, Analyse Factorielle Discriminante, PLS-DA, Partial Least Square Discriminant Analysis, ...). Le plasma a été analysé par RMN du proton sur un spectromètre Bruker DRX-600 opérant à la fréquence de 600 MHz et équipé d'une sonde cryogénique TXI 5 mm. Les échantillons de plasma nécessitent peu de préparation avant l'analyse RMN (ajout d'eau deutérée). Les spectres RMN ont ensuite été phasés, calibrés et la ligne de base corrigée. Les données RMN ont été pré-traitées de façon à obtenir un tableau de données pour l'analyse statistique. Les spectres RMN ont été découpés

en *buckets* de 0,01 ppm et chaque *bucket* a été intégré. L'intensité de chaque *bucket* a été normalisée par rapport à l'intensité totale du spectre. Les données RMN ont ensuite été filtrées par la méthode OSC (*Orthogonal Signal Correction*). C'est une méthode de filtrage qui permet de supprimer la variabilité des données (expérimentale, instrumentale, physiologique,...) contenue dans les données spectrales (matrice X) mais non corrélée au facteur d'intérêt Y (traitement). Des méthodes statistiques multivariées ont ensuite été utilisées pour traiter les données filtrées. Elles permettent l'analyse simultanée de variables mesurées sur un même individu. Quand la variabilité due au traitement était masquée par la variabilité totale des données, des méthodes supervisées, telles que la *Partial Least Squares Discriminant Analysis* (PLS-DA) ont été utilisées. La PLS-DA utilise l'information sur la classe d'appartenance des observations pour maximiser la séparation entre les groupes. Les performances du modèle ont été évaluées avec les critères  $R^2$  et  $Q^2$  cumulés. Le premier indique la proportion de variance des données Y expliquée par le modèle, le second la qualité de prédiction du modèle (part de variation prédite par le modèle). Le calcul du  $Q^2$  est effectué par validation croisée 7-fold. D'après la littérature, des valeurs de  $R^2 > 0,50$  et  $Q^2 > 0,40$  correspondent à un modèle robuste. Un test basé sur des permutations a également été utilisé pour évaluer la validité et le sur-ajustement des modèles. Dans ce test, les groupes dans la matrice Y sont aléatoirement permutés, alors que la matrice X est inchangée. Pour chaque permutation, un nouveau modèle est construit, la valeur de  $Q^2$  calculée. Cette permutation aléatoire est répétée un grand nombre de fois et les valeurs de  $Q^2$  sont représentées en fonction du « degré » de permutations dans la matrice Y. Un modèle est valide si la pente de la droite de régression estimée sur les «  $Q^2$  permutés » est négative et si tous les «  $Q^2$  permutés » sont inférieurs à la valeur du  $Q^2$  du modèle original. Les variables discriminantes potentielles sont ensuite déterminées par les coefficients du modèle de régression (*Variable Importance in the Projection - VIP*). Un test de Kruskal-Wallis a ensuite été utilisé pour ne garder que les variables réellement discriminantes. Une valeur de probabilité inférieure à 0,05 signifie que la variable est discriminante entre deux groupes. La structure des métabolites impliqués dans la séparation des groupes a ensuite été déterminée à l'aide des spectres RMN 1D et 2D, de façon à proposer une interprétation physiologique des perturbations métaboliques observées.

### 1.3 Etude de l'expression des ABC transporteurs

Pour répondre à la question : « l'exposition chronique au mélange de pesticide peut-elle affecter l'efficacité de la barrière active de l'intestin ? », nous avons testé *in vivo* le potentiel inducteur ou répresseur des pesticides sur l'expression des ARNm des différents transporteurs (PCR quantitative) au niveau du duodénum des animaux.

### 1.4 Etude du statut oxydoréducteur

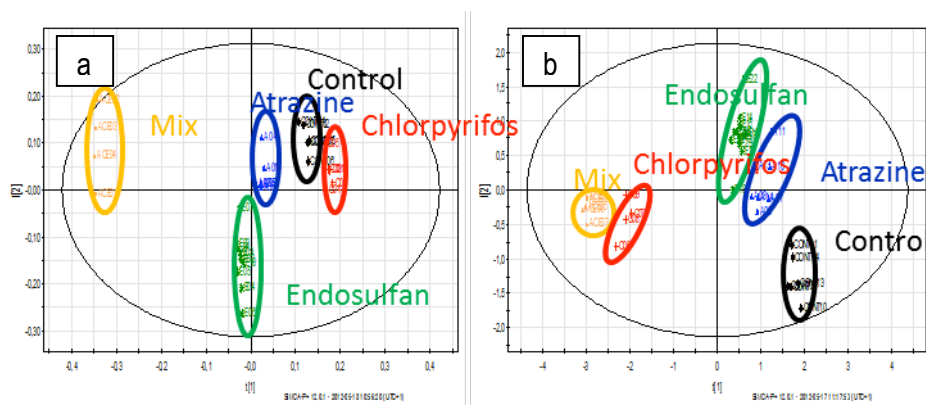
Nous avons quantifié le glutathion érythrocytaire (sang) et les coenzymes Q9 et Q10 (plasma) standardisé par rapport lipides (triglycérides et cholestérol total). Les mécanismes adaptatifs ont été appréhendés par la mesure cinétique des activités enzymatiques antioxydantes (SOD, catalase et GPx érythrocytaires). Les dommages oxydatifs lipidiques ont été caractérisés par la mesure des MDA-TBARS. L'analyse statistique a été conduite à l'aide d'une ACP. L'évaluation a aussi été conduite sur extrait de moelle osseuse.

## 2 Résultats

### 2.1 Analyse de l'empreinte métabolique de l'exposition alimentaire aux pesticides seuls ou en mélanges

Les analyses PLS-DA obtenues à partir des spectres RMN de plasma, des souris âgées de 14 semaines traitées ou non avec de l'atrazine, endosulfan, chlorpyrifos ou le mélange des trois pesticides montrent clairement des empreintes métaboliques différentes suivant le traitement et le sexe (Figure 1). L'identification des métabolites discriminants dans chaque traitement et chaque tissu ou organe est présentée dans le Tableau 1.

L'empreinte métabolique des plasmas des mâles (Figure 1a, Tableau 1a), montre que tous les groupes exposés aux pesticides individuels ou au mélange ont une empreinte métabolique plasmatique distincte de celle des animaux contrôles. Cependant, les animaux exposés au chlorpyrifos et à l'atrazine ont une empreinte métabolique proche de celle des animaux témoins. L'exposition au mélange est associée à une empreinte métabolique spécifique, distincte de celle observée chez les animaux exposés aux pesticides seuls. Les métabolites discriminants dans le plasma des mâles exposés au mélange comparativement à ceux exposés aux pesticides seuls sont la glutamine, la valine, et la diméthylamine.



**Figure 1** : Résultats de l'analyse PLS-DA des plasmas des individus mâles (a) et femelles (b) après exposition aux pesticides seuls ou en mélange (Mix) depuis le développement fœtal jusqu'à l'âge adulte.

Chez les femelles (Figure 1b, Tableau 1b), l'exposition au mélange de pesticides ou aux pesticides seuls est associée à des variations métaboliques plasmatiques distinctes de celles observées chez les animaux contrôle. Les variations métaboliques induites après exposition au mélange sont proches de celles observées après exposition au chlorpyrifos. Un des métabolites discriminant le groupe exposé au mélange ou aux pesticides seuls du groupe contrôle est le glucose. Les empreintes métaboliques des femelles exposées à l'atrazine ou à l'endosulfan sont assez proches de celle des animaux témoins.

### 2.2 Expression de transporteurs membranaires dans l'intestin de souris exposées ou non aux pesticides seuls ou en mélange

Nous avons étudié l'expression des principaux ABC transporteurs, abcb1a et 1b (les 2 formes de la P-glycoprotéine ou P-gp exprimées chez les rongeurs), abcg2, abcc2 et c3 dans le duodénum de souris exposées depuis le développement fœtal jusqu'à l'âge adulte (Tableau 2). Les variations les plus importantes sont observées chez les mâles, chez lesquels une diminution d'expression de abcb1-a dans le duodénum après exposition au chlorpyrifos et à l'atrazine ainsi qu'une augmentation de l'expression de abcg2 après exposition à l'endosulfan ont été observées. Il est toutefois important de noter que les résultats obtenus chez les animaux exposés à l'atrazine ou à l'endosulfan sont basés sur un faible nombre d'individus (n=4 et n= 5, respectivement).

**Tableau 1 :** Variations des métabolites endogènes induites après l'exposition aux pesticides dans le plasma des individus mâles (a) et femelles (b). Les échantillons issus des plasmas des animaux exposés aux pesticides ont été comparés au groupe témoin contrôle (contrôle/atrazine = Cont/A ; contrôle/chlorpyrifos = Cont/C ; contrôle/endosulfan = Cont/E ; contrôle/mélange = Cont/Mix). Les groupes d'animaux exposés au mélange ont été comparés à chacun des groupes exposés aux pesticides isolés (Atrazine/Mélange = A/Mix ; Chlorpyrifos/Mélange = C/Mix ; Endosulfan/Mélange = E/mix). Dans le cas de composés inconnus, les déplacements chimiques en  $^1\text{H}$  NMR sont indiqués (ppm).

**a :** Empreinte métabolique des plasmas des individus mâles.

Metabolites	Cont/A	Cont/C	Cont/E	Cont/Mix	A/Mix	C/Mix	E/Mix
Glucose		+	+	+	+		+
Glycerophospho choline/ Phosphocholine	-	-			+		+
choline		-		-			
glutamate					-		
Lactate		-	-	-	-		-
Unknown compounds 3.755 ; 3.765 ; 3.775 ; 3.785 ppm		+	+	+	+		

**b :** Empreinte métabolique des plasmas des individus femelles

Metabolites	Cont/A	Cont/C	Cont/E	Cont/Mix	A/Mix	C/Mix	E/Mix
Glucose	+		+				-
GPC/PCho	+	+					
glutamine				+		+	
Lactate		+	+	+			
dimethylamin e				+			+
Valine			+	+		+	
Leucine Isoleucine				+			
Unknown compounds 3.695 ; 3.705 ; 3.715 ; 3.725 ; 3.735 ; 3.745 ppm	-	-	-	-	-	-	-
Unknown 3.355 ppm		-					

L'exposition au mélange de pesticides entraîne une légère augmentation de l'expression d'abcg2 chez les mâles. La baisse de l'expression d'abcc2 dans le duodénum de mâles exposés au chlorpyrifos est issue d'une seule expérimentation. De plus, il est important de noter que les résultats concernant abcb1b sont à prendre avec précaution puisque ce gène est très faiblement exprimé. Chez les femelles, une augmentation faible de l'expression d'abcg2 a été observée.

Nos résultats témoignent qu'une exposition à long terme à de faibles doses de pesticides exerce un impact sur la barrière intestinale et notamment sur un des principaux acteurs de la protection de l'organisme qui est abcb1. La baisse d'abcb1 observée dans le duodénum après exposition au

chlorpyrifos peut avoir un impact important sur le devenir de contaminants ou de médicaments substrats.

**Tableau 2** : Variations de l'expression relative des ABC transporteurs dans le duodénum de souris mâles ou femelles exposées ou non aux pesticides seuls ou en mélange (exprimées en moyenne  $\pm$  SD avec \*  $p < 0,05$  et \*\*  $p < 0,001$ ).

Male	abcb1a	abcb1b	abcg2	abcc2	abcc3
contrôle	1,00 $\pm$ 0,22	1,00 $\pm$ 0,29	1,00 $\pm$ 0,07	1,00 $\pm$ 0,14	1,00 $\pm$ 0,18
A	0,66 $\pm$ 0,22	1,00 $\pm$ 0,28	1,06 $\pm$ 0,08	0,77 $\pm$ 0,30	0,96 $\pm$ 0,20
C	0,56 $\pm$ 0,18**	0,89 $\pm$ 0,34*	1,05 $\pm$ 0,09	0,65 $\pm$ 0,20**	1,03 $\pm$ 0,24
E	0,81 $\pm$ 0,31	1,30 $\pm$ 0,14	1,22 $\pm$ 0,13**	0,82 $\pm$ 0,49	1,04 $\pm$ 0,36
ACE	0,88 $\pm$ 0,17	1,09 $\pm$ 0,26	1,23 $\pm$ 0,13**	0,79 $\pm$ 0,37	1,14 $\pm$ 0,56

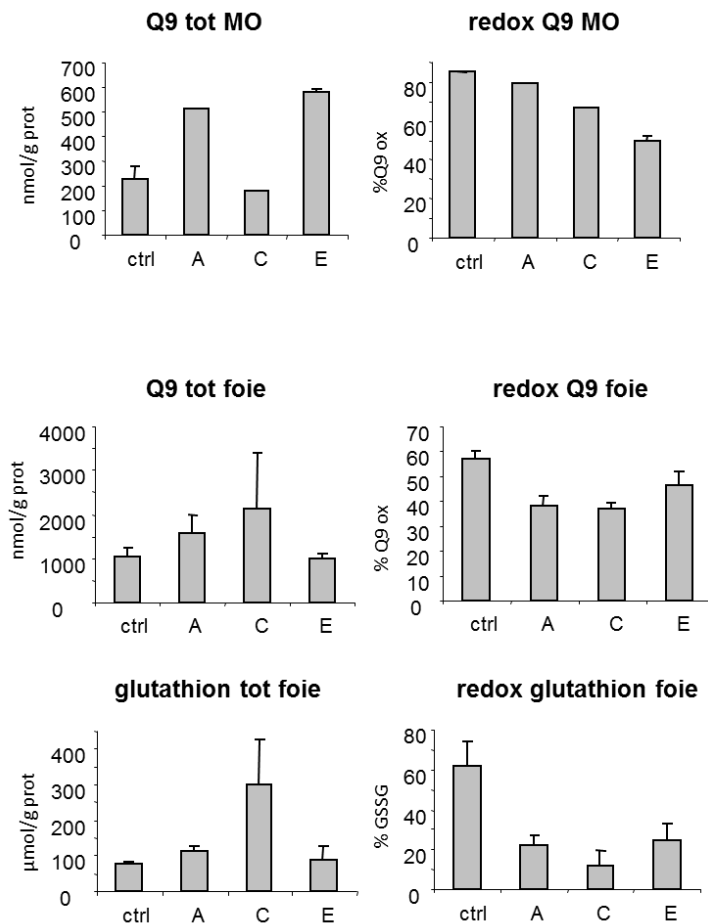
  

Femelle	abcb1a	abcb1b	abcg2	abcc2	abcc3
controle	1,21 $\pm$ 0,53	1,04 $\pm$ 0,18	0,96 $\pm$ 0,15	1,00 $\pm$ 0,21	0,98 $\pm$ 0,32
A	0,94 $\pm$ 0,38	0,88 $\pm$ 0,12	0,87 $\pm$ 0,17	0,98 $\pm$ 0,31	1,09 $\pm$ 0,48
C	1,07 $\pm$ 0,38	1,00 $\pm$ 0,17	1,03 $\pm$ 0,14	1,09 $\pm$ 0,31	0,95 $\pm$ 0,48
E	1,16 $\pm$ 0,40	0,82 $\pm$ 0,18*	1,15 $\pm$ 0,15*	1,07 $\pm$ 0,33	0,82 $\pm$ 0,43
ACE	1,04 $\pm$ 0,55	1,12 $\pm$ 0,18	1,05 $\pm$ 0,16	1,14 $\pm$ 0,34	1,10 $\pm$ 0,43

### 2.3 Mesure du statut oxydoréducteur dans divers tissus et fluides biologiques chez les souris traitées et non traitées

Le coenzyme Q total et son équivalent réduit, le glutathion total et son équivalent réduit (redox), marqueurs du métabolisme d'oxydoréduction, ont été évalués dans la moelle osseuse (MO) et le foie des souris témoins et exposées à l'endosulfan (E), au chlorpyrifos (C) ou à l'atrazine (A). Ces deux tissus ne montrent pas le même profil du métabolisme d'oxydoréduction. En effet, seule la moelle des souris traitées par l'endosulfan contient plus de coenzyme Q et celui-ci est fortement réduit, ce qui traduit un métabolisme mitochondrial perturbé avec une hypothèse de contrainte sur le fonctionnement de la chaîne respiratoire dont l'étiologie reste à définir. Le foie des souris exposées présentent une modification du redox qui semble produit-dépendante, à la fois pour le coenzyme et le glutathion. Le foie des souris traitées par (A) et (C) ont un compartiment hydrophile (% de glutathion oxydé – GSSG) et lipophile (% de coenzyme Q9 oxydé) plus réduit que celui des souris témoins ou exposées à (E). La régulation par une augmentation de la synthèse en coenzyme Q9 et en glutathion semble plus efficace dans le foie des souris exposées à (C) (Figure 2).





**Figure 2** : Mesure du métabolisme redox dans les tissus des souris traitées (MO : moelle osseuse ; foie) par évaluation du statut redox du coenzyme Q et du glutathion.

## Conclusions

Dans cette étude nous avons établi chez la souris un modèle d'exposition alimentaire à de faibles doses de pesticides qui mime celle du consommateur. Nous avons utilisé une méthode globale sans a priori pour caractériser cette exposition au niveau plasmatique et nous avons comparé les marqueurs et les effets des pesticides isolés ou en mélanges.

Nos résultats montrent que la métabonomique peut être développée chez les mammifères pour caractériser au niveau plasmatique l'exposition alimentaire aux faibles doses de pesticides isolés ou en mélange. De plus, l'analyse des métabolites discriminants entre les groupes permet d'apporter des éléments de réponse quant au mécanisme d'action de ces composés en complément des données biochimiques ou de biologie cellulaire ou moléculaire. Par ailleurs, nous pouvons d'ores et déjà envisager que la barrière des transporteurs actifs est modifiée par l'exposition à long terme à de faibles doses de certains pesticides, ce qui peut avoir des conséquences sur la biodisponibilité et la toxicité des composés étudiés, mais aussi d'autres contaminants ou médicaments. Dans notre modèle et sur ce paramètre, l'effet du mélange ne peut pas être prédits à partir de l'effet des pesticides pris individuellement, ce qui suggère la nécessité de mettre en place des méthodes d'évaluation de l'effet des mélanges au cours du processus d'autorisation de mise sur le marché de ces substances. De plus, les études du statut oxydoréducteur dans la moelle osseuse et le foie laissent supposer que le métabolisme énergétique couplé aux oxydations phosphorylantes des cellules de la moelle osseuse est perturbé par la présence d'endosulfan, même à faible dose, ce qui pourrait engendrer une adaptation vers un métabolisme énergétique de type glycolytique. Ces résultats sont intéressants car ils peuvent

être rapprochés de ceux obtenus au cours d'une étude précédente financée par l'ANR. En effet dans cette étude nous avons montré (résultats en cours de publication) que l'endosulfan pouvait induire de forte perturbation de l'hématopoïèse, notamment sur la lignée rouge chez les animaux exposés à la même dose via l'alimentation. Les résultats obtenus au cours de l'étude présentée ici suggèrent qu'un stress oxydant pourrait être à l'origine de l'effet induit après exposition à l'endosulfan. Le foie des souris exposées aux pesticides présente également des perturbations du métabolisme d'oxydoréduction plus diversifiées qui pourraient revêtir un caractère délétère de stress oxydant dont il faudrait définir les composantes.

### Références bibliographiques

- Alavanja M.C., Bonner M.R., 2012. Occupational pesticide exposures and cancer risk: a review. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part B, Critical Reviews* 15, 238–263.
- Desaulniers D., Leingartner K., Pelletier G., Xiao G.H., Bowers W.J., 2012. Effects of developmental exposure to mixtures of environmental contaminants on the hepatic metabolism of estradiol-17beta in immature female Sprague Dawley rats. *International Journal of Toxicology* 31, 454–466.
- EFSA, 2010a. 2008 Annual report on pesticide residues according to article 32 of Regulation (EC) N° 396/2005. *EFSA Journal* 8, 1646.
- EFSA, 2010b. 2008 Annual report on pesticides residues according to article 32 of regulation (EC) N° 396/2005. European food safety authority (EFSA), Parma, Italy.
- Elabbas L.E., Finnilä M.A., Herlin M., Stern N., Trossvik C., Bowers W.J., Nakai J., Tuukkanen J., Heimeier R.A., Åkesson A., Håkansson H., 2011. Perinatal exposure to environmental contaminants detected in Canadian Arctic human populations changes bone geometry and biomechanical properties in rat offspring. *Journal of Toxicology and Environmental Health A* 74, 1304–1318.
- Hernández A.F., Parrón T., Tsatsakis A.M., Requena M., Alarcón R., López-Guarnido O. Toxic effects of pesticide mixtures at a molecular level: Their relevance to human health. *Toxicology*, in press.
- Kortenkamp A., Faust M., 2010. Combined exposures to anti-androgenic chemicals: steps towards cumulative risk assessment. *International Journal of Andrology* 33, 463–474.
- Lafiura K.M., Bielawski D.M., Posecion N.C. Jr, Ostrea E.M. Jr, Matherly L.H., Taub J.W., Ge Y., 2007. Association between prenatal pesticide exposures and the generation of leukemia-associated T(8;21). *Pediatric Blood and Cancer* 49, 624–628.
- Merhi M., Raynal H., Cahuzac E., Vinson F., Cravedi J.P., Gamet-Payrastre L., 2007. Occupational exposure to pesticides and risk of hematopoietic cancers: meta-analysis of case-control studies. *Cancer Causes and Control* 18, 1209–1226.
- Orton F., Rosivatz E., Scholze M., Kortenkamp A., 2012. Competitive androgen receptor antagonism as a factor determining the predictability of cumulative antiandrogenic effects of widely used pesticides. *Environmental Health Perspectives* 120, 1578–1584.
- Van Maele-Fabry G., Lantin A.C., Hoet P., Lison D., 2011. Residential exposure to pesticides and childhood leukaemia: a systematic review and meta-analysis. *Environment International* 37, 280–291.
- Vinson F., Merhi M., Baldi I., Raynal H., Gamet-Payrastre L., 2011. Exposure to pesticides and risk of childhood cancer: a meta-analysis of recent epidemiological studies. *Occupational and Environmental Medicine* 68, 694–702.