

RAPPORT D'ACTIVITÉ 2017

LABORATOIRE DE FOUGÈRES

anses
agence nationale de sécurité sanitaire
alimentation, environnement, travail



Connaître, évaluer, protéger

Les 61 agents du Laboratoire de Fougères disposent d'une expérience technique et scientifique reconnue dans les domaines de l'analyse des résidus dans les denrées alimentaires d'origine animale, l'évaluation des effets antibactériens des antibiotiques et biocides, la modélisation du devenir et des effets des substances après exposition des animaux, et la caractérisation de dangers toxicologiques pour la santé humaine tels que des contaminants naturels (toxines) ou associés aux activités humaines (produits phyto-sanitaires, nanomatériaux). Ces savoir-faire contribuent à la surveillance de dangers dans le cadre de ses mandats de référence : laboratoire national de référence (LNR) pour les résidus de médicaments vétérinaires et pour la résistance aux antibiotiques, laboratoire de référence de l'Union européenne (LRUE) pour les résidus d'antibiotiques et de colorants à activité pharmacologique. Les connaissances acquises dans le cadre de ses travaux de recherches, menés sous forme de projets nationaux ou européens, sont utilisées pour progresser dans l'évaluation des risques via l'expertise de ses scientifiques.

PRÉSENTATION DES GRANDES ÉVOLUTIONS INTERNES OU EXTERNES

L'évaluation des risques associée à l'exposition à des substances toxiques via l'alimentation est au cœur des préoccupations des consommateurs et des responsabilités de l'Anses. Il est important de progresser en matière de surveillance des contaminants, comme dans l'identification de leurs effets toxiques potentiels. Plusieurs évolutions récentes sont observées et influent sur les orientations des travaux du laboratoire.

Les progrès dans le domaine des sciences analytiques conduisent à une amélioration continue de la sensibilité des appareils de spectrométrie de masse et accroissent la capacité de surveillance en matière de contaminants chimiques dans l'alimentation. Grâce à l'acquisition d'un nouveau système d'analyse non ciblée en fin d'année 2016, l'unité d'analyse des résidus et contaminants va élargir sa capacité à développer des méthodes analytiques dites non ciblées, permettant la recherche simultanée de substances connues au cours d'une même analyse, via le recours à des méthodes d'exploitation de bases de données chimiques de plus en plus larges. La mise en place d'un nouveau dispositif informatique de recueil et de remontée de données d'analyses physico-chimiques progresse rapidement au niveau européen. Un travail en relation avec les informaticiens et les épidémiologistes a été mené en 2017 visant à développer des outils d'amélioration continue de la qualité des données issues des laboratoires (projets Qualiplan et data quality) et dans le but d'un transfert de ces données analytiques (résidus de médicaments vétérinaires) à l'EFSA.

Lorsque des contaminants sont mis en évidence, il est important de disposer d'une caractérisation la plus fine possible des dangers qu'ils représentent. Pour répondre à la diversité des contaminants rencontrés et à leurs effets en mélange et à la demande sociétale et réglementaire en matière de réduction du recours à l'expérimentation animale, de nouveaux modèles cellulaires humains en co-culture et en 3D, sont développés et

commercialisés pour une meilleure représentation structurale et fonctionnelle des organes. Afin d'étudier les effets toxiques *in vitro*. L'unité de toxicologie des contaminants a proposé, avec ses partenaires scientifiques, des travaux innovants sur ces nouvelles approches de culture cellulaire.

La résistance aux antibiotiques reste un sujet d'actualité sanitaire, en témoigne la mobilisation au plus haut niveau international en 2016, avec la déclaration visant à lutter contre l'augmentation des infections résistantes aux médicaments antimicrobiens du 21 septembre par le Secrétaire général de l'ONU, à l'occasion de leur assemblée générale et de nombreuses organisations internationales. En France, de nombreux changements sont en cours dans la manière d'utiliser les antibiotiques comme médicaments vétérinaires, sous l'impulsion du plan Ecoantibio et de nouveaux outils de financement des recherches se mettent en place aux niveaux européen et international, ouvrant de nouvelles opportunités au laboratoire, notamment pour l'étude de la relation pharmacologique entre les traitements et les phénomènes de sélection de bactéries résistantes, sujet qui devient très important dans un cadre de rationalisation des usages. L'évolution majeure porte sur la surveillance épidémiologique de gènes de résistance vis-à-vis des antibiotiques critiques tels que les céphalosporines, carbapénèmes, fluoroquinolones ou colistine.

- > **582** rapports d'analyse émis
- > **6** EILA organisés par les **2** LNRs et le LRUE sous accréditation ISO 17043
- > **29** publications
- > **45** Communications orales et affichées dans des congrès internationaux

CHRONOLOGIE



TRAVAUX RÉALISÉS

RÉSIDUS

Dans le cadre de ses mandats de référence en matière de résidus de médicaments vétérinaires, le laboratoire a poursuivi ses développements et validations de méthodes analytiques, notamment pour la détection et confirmation des macrolides et beta-lactamines dans le muscle, de l'amitrazé et ses métabolites dans les œufs, et le muscle, des anthelminthiques dans les œufs ainsi que l'organisation d'essais inter-laboratoires et d'ateliers de formation pour les laboratoires agréés et reconnus. La réalisation d'un plan de surveillance pour la recherche de contamination par des antibiotiques d'aliments composés pour animaux (porcins, volaille et lapins) prélevés dans les élevages a été menée pour la première fois.

En termes de recherche, deux thèses ont été soutenues dans ce domaine sur la « caractérisation de la performance et validation des méthodes de dépistage des résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires » et sur l'« occurrence des résidus et contaminants chimiques dans les miels produits et consommés au Liban - développement et standardisation de méthodes de dépistage adaptées - application aux résidus d'antibiotiques », cette dernière a été menée en partenariat avec nos homologues libanais.

RÉSISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

En tant que LNR, le laboratoire a réalisé les analyses de mesures de concentrations minimales inhibitrices (CMI) de plusieurs antibiotiques pour les souches d'*E. coli* isolées chez le poulet de chair et la dinde (*caeca* et viande) dans le cadre des plans de surveillance 2017 et communiqué sur les plans de surveillance réalisés en 2016, chez le porc et le veau (*caeca* et viande).

Le laboratoire a analysé les échantillons collectés au cours de l'étude d'intervention en élevages aviaire et porcin menée dans le cadre du projet européen Effort (www.effort-against-amr.eu) en collaboration avec nos collègues du Laboratoire de Ploufragan-Plouzané.

TOXICOLOGIE

Le laboratoire a poursuivi ses travaux de recherche au travers de plusieurs projets nationaux et européens. Les effets toxiques de diverses substances (toxines, nanoparticules, mélanges), au niveau de l'intestin et du foie principalement, sont déterminés à l'aide d'études *in vitro* et *in vivo*. Au cours d'une thèse en partenariat avec notre homologue allemand du BfR, des études portant sur le métabolisme et l'absorption intestinale de phycotoxines ont été réalisées. Les travaux portant sur les effets de mélanges de contaminants retrouvés dans l'alimentation ont continué (thèse co-financée avec l'Inra de Toulouse). Enfin, la mise en place d'un test sur cellules Neuro2A pour la détection des ciguatoxines avec la réalisation d'essais inter-laboratoires a été poursuivie.

PLATEFORME PAS ET GUIDE DE VALIDATION

La plateforme PAS via son animateur a été chargée d'animer un groupe intra-Anses sur l'harmonisation des processus de transfert de méthode analytique de type biologique ou physico-chimique. Cette harmonisation se traduit par un guide, qui sera mis en application durant le 1^{er} trimestre 2018, après avoir été mis en consultation en interne (laboratoire de référence) et auprès des laboratoires agréés et des tutelles.



PROJETS MENÉS À TERME

Des projets ont été menés dans le cadre des activités du mandat de référence du LR-UE pour évaluer et valider deux méthodologies biologiques pour la détection de médicaments vétérinaires dans des denrées alimentaires à des fins d'autocontrôles. Les performances d'outils rapides basés sur des tests Elisa ont été testées pour détecter simultanément des antibiotiques dans le muscle à l'aide d'un cytomètre de flux couplé à des billes ou dans le lait à l'aide d'une biopuce.

APR Anses-2013-Meca Genotox : ce projet coordonné par l'Institut de recherche en santé, environnement et travail (Irset) a permis le développement d'un modèle de culture 3D, qui mime les différentes forces de tension accrues lors du développement de la fibrose hépatique. Il a montré que les hépatocytes humains cultivés dans des gels de collagène prolifèrent davantage et sont plus différenciés qu'en culture 2D. De plus, leur capacité à métaboliser les contaminants de l'environnement est augmentée avec en particulier des activités fonctionnelles de plusieurs cytochromes P450 (CYP) plus élevées dans les gels les plus rigides. Ce modèle 3D de cellules hépatiques apparaît comme un modèle alternatif pour l'étude de la génotoxicité des contaminants de l'environnement.

Deux projets regroupant plusieurs équipes européennes se sont achevés fin 2017 : le projet ANR bilatéral France/Allemagne Solnanotox et le projet EFSA Mycotox.

Le projet EFSA Mycotox, coordonné par l'ISS (Italie), et financé par l'autorité européenne, s'est attaché à étudier les effets toxiques, reprotoxiques, neurotoxiques et génotoxiques de deux mycotoxines émergentes, la beauvéricine et l'enniatine-B. Ces toxines sont régulièrement retrouvées dans l'alimentation humaine, mais le manque de données de toxicité ne permet pas à ce jour de pouvoir fixer des valeurs toxicologiques de référence. Différentes études de toxicité par voie orale chez la souris ont été réalisées pour apporter de nouvelles données : une étude de toxicité sub-chronique de 42 jours chez les souris mâle et femelle, ainsi que chez la souris gestante, couplée à une évaluation de la génotoxicité sur différents organes. En parallèle, des études de génotoxicité aiguës ont également été menées. Ce projet a permis d'écarter un risque génotoxique en ce qui concerne la beauvéricine, alors que des dommages à l'ADN ont été mis en évidence par le test des comètes au niveau du foie et de la moelle osseuse uniquement après une exposition aiguë de 100 et 200 mg/kg/jour avec l'enniatine-B. Les études subchroniques ont montré que la beauvéricine induisait des effets au niveau du système immunitaire et des glandes surrénales, alors que l'enniatine-B induisait des effets au niveau intestinal, du thymus, de l'utérus et de la rate. Aucun effet sur la descendance n'a été observé. Ces travaux suggèrent que des études complémentaires doivent être menées en particulier sur l'enniatine-B afin de mieux comprendre les mécanismes d'action génotoxiques.

PROJETS ENGAGÉS

En fin d'année, le projet Eviction financé par l'ANR a été initié et a pour objectif d'étudier le lien potentiel entre l'exposition à une mycotoxine appelé DON (Deoxynivalénol) et les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), telles que la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse. L'exposition sub-chronique du DON sera évaluée dans un modèle de souris à flore intestinale humaine associée, provenant de sujets normaux ou souffrant de MICI.

Le projet Enorpreg financé par l'Anses s'intéresse à la toxicité au niveau du système mère/fœtus après exposition répétée (28 jours) par inhalation et par ingestion à des nanoparticules d'or. Ce projet coordonné par l'Insti-

tut national de la recherche agronomique (Inra) de Jouy-en-Josas intègre, parmi d'autres partenaires, l'unité de toxicologie du laboratoire pour ses compétences en génotoxicité. Ainsi, il s'agira de déterminer si ces expositions ont généré des dommages à l'ADN au niveau de différents organes collectés chez les mères et les fœtus.

Le projet Motivate soutenu par la région Bretagne vise à mettre en place de nouveaux modèles de culture *in vitro* (co-cultures et cultures 3D sous forme de sphéroïdes) aux niveaux intestinal et hépatique, afin de déterminer quels seront les apports de ces modèles dans les tests *in vitro* destinés à l'évaluation de la toxicité et en particulier de la génotoxicité.

PROJETS ENGAGÉS (SUITE)

La thèse Morphines a pour but d'utiliser des modèles intestinaux intégrant le système nerveux entérique afin de mieux comprendre l'impact des phycotoxines au niveau intestinal. Les premiers travaux ont consisté à la mise en place du modèle de cellules gliales entériques puis ont évalué les effets de diverses phycotoxines sur ces cellules. Les suivants, dont certains déjà engagés, porteront sur les effets de certaines de ces phycotoxines sur des co-cultures de cellules intestinales (entérocytes et cellules à mucus) associées aux cellules gliales.

Dans le cadre du plan Ecoantibio 2017, et en collaboration avec l'ANMV, le projet Cabale a pour objectifs de consolider les connaissances en matière de stabilité des antibiotiques en présence de biocides dans les eaux d'abreuvement pour les filières porcine, avicole et cunicole. Les premiers travaux ont consisté à mettre en place les méthodes de dosage des analytes d'intérêt par LC-UV puis à réaliser des études cinétiques de dégradation de l'antibiotique en présence de biocides (chlore actif ou peroxyde d'hydrogène) dans deux types d'eau standardisées (eau douce et eau dure). La phase suivante consistera à poursuivre ces études cinétiques, sur des eaux d'élevage sélectionnées avec les filières.

PRINCIPALES PUBLICATIONS

Gaudin, V., Advances in biosensor development for the screening of antibiotic residues in food products of animal origin – A comprehensive review. *Biosensors and Bioelectronics*, 2017. 90: p. 363-377.

Viel A, Henri J, **Perrin-Guyomard A**, Laroche J, Couet W, Grégoire N, et al. Lack of experimental evidence to support mcr-1-positive *Escherichia coli* strain selection during oral administration of colistin at recommended and higher dose given by gavage in weaned piglets. *Int J Antimicrob Agents*. 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.04.013>

El Hawari, K., Al Iskandarani M., Mompelat S., Hurtaud-Pessel D., Verdon E. (2017). 'Design for the transfer of a validated LC-MS/MS analytical method for the determination of antimicrobial residues in honey from Low Resolution to High Resolution Mass Spectrometry'. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, DOI: 10.1002/rcm.7899

EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), Antonia Ricci, Ana Allende, Declan Bolton, Marianne Chemaly, Robert Davies, Pablo Salvador Fernandez Escamez, Rosina Girones, Kostas Koutsoumanis, Roland Lindqvist, Birgit Nørrung, Lucy Robertson, Giuseppe Ru, Moez Sanaa, Marion Simmons, Panagiotis Skandamis, Emma Snary, Niko Speybroeck, Benno Ter Kuile, John Threlfall, Helene Wahlström, Björn Bengtsson, Damien Bouchard, Luke Randall, Bernd-Alois Tenhagen, **Eric Verdon**, John Wallace, Rosella Brozzi, Beatriz Guerra, Ernesto Liebana, Pietro Stella and Lieve Herman. (2017)

"Risk for the development of Antimicrobial Resistance (AMR) due to feeding of calves with milk containing residues of antibiotics», January 2017, doi: 10.2903/j.efsa.2017.4665, *EFSA Journal* 2017; 15(1):4665

Dervilly-Pinel G., Guérin T., Minvielle B., Travel A., Normand J., Bourin M., Royer E., **Dubreil E., Mompelat S.**, Hommet F., Nicolas M., Hort V., Inthavong C., Saint-Hilaire M., Chafey C., Parinet J., Cariou R., Marchand P.; Le Bizec B., **Verdon E.**, Engel E. (2017), «Micropollutants and chemical residues in organic and conventional meat», *Journal of Food Chemistry*, 232, 218-228

Alarcan J, Dubreil E, Huguet A, Hurtaud-Pessel D, Hessel-Pras S, Lampen A, Fessard V, Le Hégarat L. Metabolism of the Marine Phycotoxin PTX-2 and Its Effects on Hepatic Xenobiotic Metabolism: Activation of Nuclear Receptors and Modulation of the Phase I Cytochrome P450. *Toxins (Basel)*. 2017, 9(7).

DÉMARCHE DE RECHERCHE D'ALTERNATIVES AU FORMALDÉHYDE

Dans une démarche de recherche d'alternatives au formaldéhyde, un nouveau groupe fonctionnel d'additifs pour la décontamination des aliments pour animaux et des salmonelles dans les aliments pour animaux a été créé (règlement européen n° 2015/2294 du 9 décembre 2015). Dans le cadre de l'évaluation des risques, la question se posait de leur capacité à sélectionner de la résistance aux antibiotiques.

L'objectif de ce projet, objet d'une convention recherche-développement (CRD), était de produire des données sur la capacité d'adaptation et l'évolution de leur phénotype de résistance aux antibiotiques d'une sélection de dix souches de *Salmonella* sérotype *Typhimurium* au cours d'une exposition à une série de treize acides organiques représentatifs de différentes structures chimiques, potentiellement utilisables. Les souches, qu'elles soient préalablement exposées ou non aux acides organiques, présentent la même sensibilité vis-à-vis des acides organiques. Des résistances croisées stables se sont développées vis-à-vis de quatre antibiotiques chez différentes souches après exposition à huit des treize acides organiques testés. Une évolution des bactéries sous forme viables non cultivables (VNC) a été également démontrée suite à l'exposition à certains acides organiques. Après confirmation de ces résultats sur l'évolution de phénotypes de résistance et de viabilité, il est envisagé d'évaluer si ces évolutions sont également retrouvées dans des conditions proches du terrain en présence d'aliments.

THÈSE ET COLLABORATION INSERM/ANSES SUR LA COLISTINE

La colistine, connaît un nouvel essor en médecine humaine comme l'antibiotique de dernier recours pour lutter contre les germes Gram(-) multi-résistants notamment lors d'infections nosocomiales. Elle est également utilisée en médecine vétérinaire, ce qui a motivé la Commission européenne à saisir l'Agence européenne du médicament, sur l'impact de son usage vétérinaire sur les santé humaine et animale. Dans un souci de synergie, le Laboratoire Pharmacologie des anti-infectieux, U-1070 Inserm de Poitiers, leader pour l'étude de la pharmacocinétique de la colistine en médecine humaine, et le Laboratoire de Fougères ont collaboré, au travers d'une thèse intitulée « Usages de la colistine en médecines humaine et vétérinaire : exploration pharmacocinétique et problématique d'antibiorésistance » soutenue fin 2017. Les travaux ont permis (1) d'observer que les risques de sélection de résistance à la colistine codée par le gène *mcr-1* était très faible chez des porcelets traités à la colistine, et que la population résistante ne s'implantait pas durablement dans l'intestin et (2) de développer un modèle pharmacocinétique basé sur la physiologie (PBPK) chez le porc, qui a permis de caractériser la distribution tissulaire de la colistine, notamment son accumulation dans le rein, facteur de la toxicité chez l'homme. Le modèle PBPK a permis la détermination de temps d'attente chez l'animal et a été utilisé pour réaliser une extrapolation inter-espèces du porc à l'homme, puis une extrapolation posologique adulte-enfant.

PROJET ANR BILATÉRAL FRANCE/ALLEMAGNE SOLNANOTOX

Le projet ANR bilatéral France/Allemagne Solnanotox, coordonné par l'unité de toxicologie des contaminants du laboratoire et regroupant trois équipes françaises et trois équipes allemandes, s'est terminé après quatre ans d'investigation pour étudier le devenir et les effets de diverses nanoparticules (oxyde de titane et aluminium) sur l'intestin, organe de contact lors de l'ingestion de ces nanoparticules, et le foie, souvent considéré comme un organe d'accumulation au cours du temps. Ce projet a mis en évidence peu d'effets des différentes nanoparticules sur des cellules humaines intestinales et hépatiques en culture, même si toutes les nanoparticules testées ont bien pénétré à l'intérieur des cellules. Seules des modulations de l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques ont été observées après des administrations répétées des oxydes de titane. Cependant, de nombreux problèmes associés aux interférences des nanoparticules avec les tests *in vitro* ont été soulignés, ce qui ne permet pas toujours de conclure sur la toxicité de ces nanoparticules. De plus, il est parfois difficile de surmonter les difficultés techniques rencontrées pour s'affranchir des interférences. À la différence des oxydes de titane inertes, les nanoparticules d'aluminium peuvent subir une dissolution et générer des ions aluminium. Il s'agit alors de distinguer si la toxicité observée est due aux nanoparticules ou aux ions relargués. Nos résultats dans les milieux de culture et dans un système de digestion *in vitro* montrent que les phénomènes de dissolution et d'agrégation/agglomération des nanoparticules d'aluminium varient en fonction des conditions expérimentales (pH, présence de protéines,...). À la différence des résultats *in vitro*, des effets génotoxiques *in vivo* des nanoparticules d'oxyde d'aluminium ont été observés au niveau du foie et de la moëlle osseuse. De plus, alors que les expériences *in vitro* concluent à un très faible passage de la barrière intestinale par ces nanoparticules, une distribution systémique de l'aluminium a été observée dans divers organes et fluides biologiques. Ainsi, il est apparu que, concernant l'évaluation toxicologique des nanoparticules, les études *in vitro* ne reflétaient pas toujours les résultats obtenus *in vivo* sur organisme entier. De nombreux défis restent encore à surmonter pour l'évaluation du risque de ces substances.



Agence nationale de sécurité sanitaire
de l'alimentation, de l'environnement et du travail
Laboratoire de Fougères
Batiment Bioagropolis, 10B rue Claude Bourgelat
35133 Javené
www.anses.fr
[@Anses_fr](https://twitter.com/Anses_fr)