



anses

agence nationale de sécurité sanitaire
alimentation, environnement, travail



Connaître, évaluer, protéger

RAPPORT D'ACTIVITÉ 2018

LABORATOIRE DE FOGÈRES

L'expérience des 61 agents du Laboratoire de Fougères est reconnue dans les domaines de l'analyse des résidus de médicaments vétérinaires et de biocides dans les produits animaux, la modélisation du devenir et des effets des médicaments vétérinaires, l'évaluation des effets antibactériens et la caractérisation de dangers toxicologiques pour la santé humaine des contaminants d'origine naturelle (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 pour les résidus de médicaments vétérinaires et pour la résistance aux antibiotiques, Laboratoire de référence de l'Union européenne pour les résidus d'antibiotiques et de colorants à activité pharmacologique. Les connaissances acquises dans le cadre de ses projets de recherches, nationaux ou européens, sont utilisées pour progresser dans l'évaluation des risques *via* l'expertise de ses scientifiques. Le laboratoire est en charge de la plate-forme d'analyse statistique et de la plate forme d'analyse d'images à haut contenu informatif.

CONTEXTE

L'évaluation de l'exposition aux substances chimiques d'origine naturelle ou issues des usages humains (industrie, traitements vétérinaires et phyto-sanitaires, biocides) nécessite des progrès réguliers dans le développement analytique et l'organisation des plans de surveillance et de contrôle par les États membres de l'Union européenne dans le cadre des réglementations nationale et européenne. L'évolution de la réglementation européenne en la matière va permettre de faire évoluer les stratégies de surveillance et de contrôle pour fournir des données de qualité afin de réduire les incertitudes en matière d'exposition et de développer la détection de dangers chimiques émergents par l'amélioration des techniques de spectrométrie de masse ou par la mise en place de tests cellulaires. La question scientifique du risque pour la santé due à l'exposition à ces résidus et contaminants, présents sous forme de traces en mélange, nécessite de développer de nouvelles approches méthodologiques pour caractériser

les interactions potentielles sur des réponses biologiques. Le laboratoire, par ses travaux en toxicologie, en pharmacologie et en sciences analytiques, contribue à y répondre par le développement de modèles cellulaires de nouvelle génération (3D), la robotisation des étapes de cultures cellulaires, le développement des analyses d'images à haut contenu informatif, le développement des modèles mathématiques et en s'appropriant les démarches de traitement de données issues des analyses par spectrométrie de masse à haute résolution. En parallèle, la surveillance et la mesure de l'effet des traitements antibiotiques chez les animaux et des biocides désinfectants en production agro-alimentaire, sur l'évolution de la résistance aux antibiotiques, restent au cœur de l'actualité, le recours à de nouvelles approches analytiques basées sur l'analyse du métagénome des microbiotes ouvre de nouvelles perspectives pour comprendre les phénomènes écologiques et évolutifs modifiés par l'exposition aux antibactériens.

> 651 rapports d'analyse émis

> 5 rapports d'essais inter-laboratoires d'aptitude terminés

> 22 publications

> 2 thèses en cours

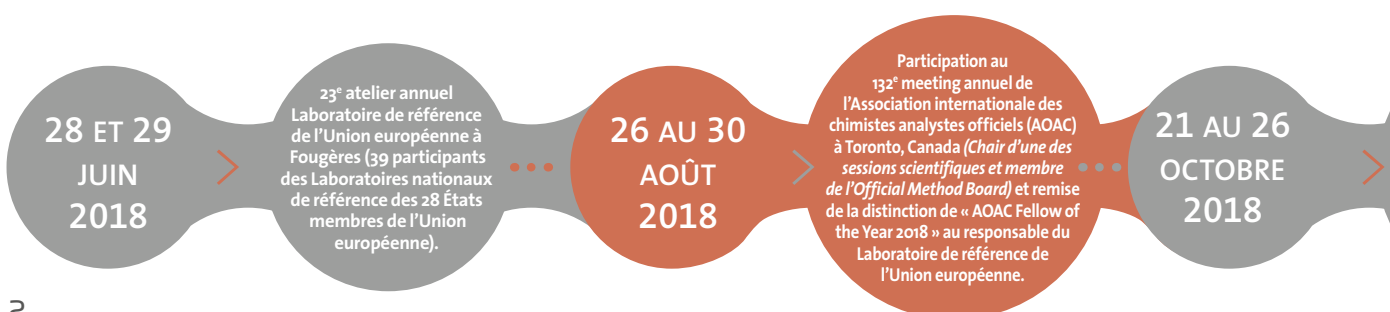
TRAVAUX RÉALISÉS ET FAITS MARQUANTS

Biocides désinfectants

Depuis quatre ans, en partenariat avec le Centre technique et d'expertise agroalimentaire et le Centre national interprofessionnel de l'économie laitière, le Laboratoire de Fougères mène des travaux sur les résidus de biocides désinfectants dans les produits laitiers au travers du projet RESBIOLACT. Dans ce projet, le Laboratoire s'est particulièrement intéressé aux méthodes

d'analyse des résidus de biocides en évaluant, d'une part, les performances des méthodes d'autocontrôle existantes des résidus de biocides désinfectants sur les surfaces et dans les eaux de rinçage et, d'autre part, en développant de nouvelles méthodes analytiques sensibles et quantitatives par spectrométrie de masse pour mesurer les résidus de biocides (ammoniums quaternaires et aminopropylamine) dans les produits

CHRONOLOGIE



TRAVAUX RÉALISÉS ET FAITS MARQUANTS (SUITE)

laitiers. La thèse de Kahina Slimani, réalisée dans le cadre de ce projet et soutenue le 26 avril 2018, a notamment contribué au développement des méthodes analytiques et a permis d'étudier l'impact des procédés de transformation du lait sur le devenir des résidus de biocides par des approches ciblées et non ciblées en spectrométrie de masse.

Le projet CRUSTAPHY a été mené en partenariat avec l'Anses, site de Boulogne-sur-Mer et ACTALIA pour identifier les facteurs environnementaux expliquant la problématique de la présence de la bactérie *Listeria monocytogenes* à l'état viable non cultivable (VNC) sur des surfaces dans l'environnement de production de crevettes cuites. Il a été démontré au cours d'essais au laboratoire que des produits de nettoyage et désinfection appliqués sur des biofilms de *Listeria monocytogenes* dans des conditions se rapprochant au plus près de celles du terrain sont responsables de l'augmentation de la proportion de ces bactéries sous forme VNC. L'apparition des bactéries à l'état viable non cultivable est également impactée par la nature du matériau de surface, la nature chimique du produit désinfectant et la flore bactérienne associée à *Listeria monocytogenes*. Dans des conditions environnementales favorables, ces bactéries peuvent revenir sous forme viable et cultivable (VC) et représenter un risque pour la sécurité alimentaire. Leur changement d'état physiologique dépend des mêmes facteurs que ceux responsables du développement des formes VNC.

Résistance aux antibiotiques

Le projet BRAVO financé dans le cadre du Plan EcoAntibio en partenariat avec l'Institut de l'élevage du porc a montré que les procédures de nettoyage et désinfection ne conduisent pas à l'évolution de la sensibilité aux antibiotiques chez des souches de *Salmonella* prélevées

au niveau de différents sites d'une chaîne d'abattage de porcs. Les analyses de la diversité bactérienne étudiée par séquençage de l'ADNr-16S montrent que les compositions de populations sont relativement stables dans le temps à un site de prélèvement donné. Pour avoir une image plus précise de l'écologie de *Salmonella* dans cet environnement alimentaire, le projet METARES qui va débuter en 2019 va étudier l'ensemble des souches et des gènes de résistance présents par une approche globale de métagénomique afin de mesurer réellement le risque de sélection de résistance aux antibiotiques par les procédures de nettoyage et désinfection.

En tant que Laboratoire national de référence, le Laboratoire a réalisé les analyses de mesures de concentrations minimales inhibitrices de plusieurs antibiotiques pour les souches d'*E. coli* isolées chez le poulet de chair et la dinde (caecac et viande) dans le cadre des plans de surveillance 2018. Une communication au cours de la journée annuelle antibiorésistance organisée par l'Anses sur les plans de surveillance réalisés en 2017 chez la volaille (poulet, dinde) dans les caecac et la viande a été réalisée, ainsi que l'intégration des résultats de ces analyses dans le rapport annuel européen édité par l'Autorité européenne de sécurité alimentaire et du Centre européen de contrôle des maladies.

Toxicologie

La thèse « Nouvelles approches en toxicologie prédictive pour l'étude de la toxicité des mélanges de contaminants présents dans l'alimentation française » de Benjamin Kopp a été soutenue à Toulouse le 12 octobre 2018. Cette thèse co-financée par l'Inra et l'Anses a associé l'unité Toxicologie des contaminants du laboratoire de l'Anses à Fougères (L. Le Hégarat) et l'unité ToxAlim de Toulouse (M. Audebert). L'objectif de cette thèse était d'étudier *in vitro* les effets génotoxiques de



TRAVAUX RÉALISÉS ET FAITS MARQUANTS (SUITE)

ces mélanges en utilisant de nouvelles approches. Pour deux mélanges, des effets génotoxiques non additifs ont été observés en raison de la présence de deux métaux lourds. Les mécanismes d'action des mélanges permettant de mieux comprendre les interactions ont également été étudiés.

Le projet MOTIVATE avec le financement d'un post-doctorat (M. Mandon) par la Région Bretagne s'est intéressé à la mise en place de modèles cellulaires en trois dimensions (3D) pour étudier la génotoxicité de xénobiotiques en comparaison des modèles cellulaires classiques en deux dimensions (2D). Des cultures de cellules hépatiques humaines HepaRG sous forme de sphéroïdes ont été mises en place. Les réponses obtenues avec le test des comètes pour évaluer les cassures de l'acide désoxyribonucléique (ADN) ont été

comparées entre modèles 2D et 3D avec des produits de référence. Les travaux ont également porté sur des organoïdes intestinaux de souris qui présentent les différents types cellulaires retrouvés au niveau de l'épithélium intestinal et qui peuvent être conservés en culture pendant plusieurs mois.

Un modèle pharmacocinétique basé sur la physiologie (PBPK) chez le porc a été développé et 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 interspèces du porc à l'homme puis une extrapolation posologique adulte-enfant.

PERSPECTIVES ET PROJETS ENGAGÉS

Dans le cadre du Programme conjoint européen « One Health, une seule santé », les équipes du Laboratoire se sont engagées dans plusieurs projets concernant l'adaptation des bactéries aux biocides désinfectants (Listadapt), les méthodes phénotypiques de détection de la résistance aux antibiotiques (Impart), l'intégration des approches pharmacocinétique et pharmacodynamique dans la modélisation systémique en évaluation du risque de la résistance aux antibiotiques (RaDAR) et la détection de toxines (Tox-Detect).

Le projet Listadapt vise à décrypter les mécanismes de l'adaptation de *Listeria monocytogenes* à ses différentes niches écologiques en étudiant des souches isolées de l'environnement, d'animaux, d'aliments et de cas cliniques provenant de plusieurs pays d'Europe. Les génomes seront entièrement séquencés et analysés pour identifier des marqueurs génétiques sous-jacents à leur adaptation à différentes niches écologiques.

Le projet IMPART (Improving phenotypic antimicrobial resistance testing) inclut quatre sujets relatifs au développement et à l'harmonisation de méthodes phénotypiques de détection de résistance microbienne et associe treize instituts vétérinaires et médicales dans neuf pays différents pour la plupart déjà impliqués dans la surveillance de la résistance aux antibiotiques.

Le projet RaDAR (Risk and Disease burden of Antimicrobial Resistance) a pour ambition de développer l'ana-

lyse systémique des déterminants du développement et de la transmission de la résistance aux antibiotiques de l'animal vers l'homme et d'améliorer les méthodes d'évaluation du risque associé à la résistance aux antibiotiques d'origine animale.

Les toxines bactériennes produites par *Staphylococcus spp.*, *Bacillus spp.* et *Clostridium spp.* sont responsables d'un grand nombre d'intoxications alimentaires en Europe avec une symptomatologie commune ne permettant pas d'identifier l'agent causal. Le projet Tox Detect développera de nouvelles approches de détection des toxines et de discrimination des souches pathogènes ou non.

Le projet SECURIVIVE financé par la Région Bretagne aborde la thématique de l'extrapolation de données *in vitro* à *in vivo*. Des données obtenues par de nouveaux modèles cellulaires en microfluidique seront extrapolées via des modèles mathématiques.

Au cours de l'année 2018, le Laboratoire a mis en place la station de pipetage rattachée à la plateforme d'imagerie AsPiC.

La plateforme d'analyse statistique a été chargée de réviser le guide statistique pour la réalisation d'essai inter-laboratoire et a participé aux travaux de la révision de la norme ISO 5725.

PRINCIPALES PUBLICATIONS

- Alarcan, J., R. Biré, L. Le Hégarat and V. Fessard (2018). «Mixtures of lipophilic phycotoxins: Exposure data and toxicological assessment.» *Marine Drugs* 16(2).
- Gaudin, V., C. Hedou, C. Soumet and E. Verdon (2018). «Multiplex immunoassay based on biochip technology for the screening of antibiotic residues in milk: validation according to the European guideline.» *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*.
- Jalili, P., N. Gueniche, R. Lanceleur, A. Burel, M. T. Lavault, H. Sieg, L. Böhmert, T. Meyer, B. C. Krause, A. Lampen, I. Estrela-Lopis, P. Laux, A. Luch, K. Hogeveen and V. Fessard (2018). «Investigation of the *in vitro* genotoxicity of two rutile TiO₂ nanomaterials in human intestinal and hepatic cells and evaluation of their interference with toxicity assays.» *NanoImpact* 11: 69-81.
- Kopp, B., J. Vignard, G. Mirey, V. Fessard, D. Zalko, L. Le Hgarat and M. Audebert (2018). «Genotoxicity and mutagenicity assessment of food contaminant mixtures present in the French diet.» *Environmental and Molecular Mutagenesis* 59(8): 742-754.
- Kopp, B., D. Zalko and M. Audebert (2018). «Genotoxicity of 11 heavy metals detected as food contaminants in two human cell lines.» *Environmental and Molecular Mutagenesis* 59(3): 202-210.
- Krause, B., T. Meyer, H. Sieg, C. Kästner, P. Reichardt, J. Tentschert, H. Jungnickel, I. Estrela-Lopis, A. Burel, S. Chevance, F. Gauffre, P. Jalili, J. Meijer, L. Böhmert, A. Braeuning, A. F. Thünemann, F. Emmerling, V. Fessard, P. Laux, A. Lampen and A. Luch (2018). «Characterization of aluminum, aluminum oxide and titanium dioxide nanomaterials using a combination of methods for particle surface and size analysis.» *RSC Advances* 8(26): 14377-14388.
- Laux, P., J. Tentschert, C. Riebeling, A. Braeuning, O. Creutzenberg, A. Epp, V. Fessard, K. H. Haas, A. Haase, K. Hund-Rinke, N. Jakubowski, P. Kearns, A. Lampen, H. Rauscher, R. Schoonjans, A. Störmer, A. Thielmann, U. Mühle and A. Luch (2018). «Nanomaterials: certain aspects of application, risk assessment and risk communication.» *Archives of Toxicology* 92(1): 121-141.
- Lucas, P., E. Jouy, L. Le Devendec, C. de Boissésou, A. Perrin-Guyomard, T. Jové, Y. Blanchard, F. Touzain and I. Kempf (2018). «Characterization of plasmids harboring bla_{CTX-M} genes in *Escherichia coli* from French pigs.» *Veterinary Microbiology* 224: 100-106.
- Munk, P., B. E. Knudsen, O. Lukjachenko, A. S. R. Duarte, L. Van Gompel, R. E. C. Luiken, L. A. M. Smit, H. Schmitt, A. D. Garcia, R. B. Hansen, T. N. Petersen, A. Bossers, E. Ruppé, H. Grave-land, A. van Essen, B. Gonzalez-Zorn, G. Moyano, P. Sanders, C. Chauvin, J. David, A. Battisti, A. Caprioli, J. Dewulf, T. Blaha, K. Wadepohl, M. Brandt, D. Wasyl, M. Skarzy ska, M. Zajac, H. Daskalov, H. W. Saatkamp, K. D. C. Stärk, O. Lund, T. Hald, S. J. Pamp, H. Vigre, D. Heederik, J. A. Wagenaar, D. Mevius, F. M. Aarestrup and E. Group (2018). «Abundance and diversity of the faecal resistome in slaughter pigs and broilers in nine European countries.» *Nature Microbiology* 3(8): 898-908.
- Rebelo, A. R., V. Bortolaia, J. S. Kjeldgaard, S. K. Pedersen, P. Leekitcharoenphon, I. M. Hansen, B. Guerra, B. Malorny, M. Borowiak, J. A. Hammerl, A. Battisti, A. Franco, P. Alba, A. Perrin-Guyomard, S. A. Granier, C. de Frutos, Escobar, S. Malhotra-Kumar, L. Villa, A. Carattoli and R. S. Hendriksen (2018). «Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, mcr-1, mcr-2, mcr-3, mcr-4 and mcr-5 for surveillance purposes.» *Eurosurveillance* 23(6).
- Slimani, K., Y. Pirotais, P. Maris, J. P. Abjean and D. Hurtaud-Pessel (2018). «Liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the analysis of N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropane-1,3-diamine, a biocidal disinfectant, in dairy products.» *Food Chemistry* 262: 168-177.
- Souton, E., I. Severin, L. Le Hegarat, K. Hogeveen, A. Aljawish, V. Fessard and C. Marie-Christine (2018). «Genotoxic effects of food contact recycled paperboard extracts on two human hepatic cell lines.» *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment* 35(1): 159-170.
- Touzain, F., L. Le Devendec, C. de Boissésou, S. Baron, E. Jouy, A. Perrin-Guyomard, Y. Blanchard and I. Kempf (2018). «Characterization of plasmids harboring bla_{CTX-M} and bla_{CMY} genes in *E. coli* from French broilers.» *PLoS ONE* 13(1).
- Viel, A., J. Henri, S. Bouchène, J. Laroche, J.-G. Rolland, J. Manceau, M. Laurentie, W. Couet and N. Grégoire (2018). «A Population WB-PBPK Model of Colistin and its Prodrug CMS in Pigs: Focus on the Renal Distribution and Excretion.» *Pharmaceutical Research* 35(5): 92.
- Viel, A., J. Henri, A. Perrin-Guyomard, J. Laroche, W. Couet, N. Grégoire and M. Laurentie (2018). «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.» *International Journal of Antimicrobial Agents* 51(1): 128-131.

Le 15 mai 2018, Jimmy Alarcán a soutenu sa thèse de doctorat à l'Université de Rennes intitulée « Effect of co-exposure to marine lipophilic biotoxins on the intestinal barrier, bioactivation and identification of molecular modes of action ». Il s'agit de la première thèse du Laboratoire à obtenir le label européen. La thèse s'est déroulée entre l'unité Toxicologie des contaminants de l'Anses à Fougères et le département de Sécurité alimentaire du BfR à Berlin. Les études ont porté sur plusieurs toxines marines afin de mieux connaître leur devenir chez l'homme après ingestion. A l'aide d'approches *in vitro* couplant biologie et chimie, le passage de la barrière intestinale ainsi que les modifications chimiques générées chez l'homme ont été étudiés. De plus, les effets combinés de mélanges de deux toxines ont été recherchés.

A l'Anses, la discipline « cinétique » qui étudie l'évolution dans le temps des molécules au sein des organismes, se fédère à l'échelle européenne. La cinétique fait le lien entre la dose externe d'exposition à une substance (molécule physo-pharmaceutique, médicament vétérinaire, contaminant) et les niveaux de concentrations internes dans l'organisme exposé (animal, consommateur). La connaissance de la cinétique est une connaissance clé dans le processus d'évaluation des risques. A l'initiative des pôles Référence-Recherche et Sciences pour l'Expertise, une réunion scientifique sur le sujet de la pharmacocinétique basée sur la physiologie (PBPK) et son implication dans l'évaluation du risque a été organisée, à Maisons-Alfort, les 22 et 23 novembre, avec les scientifiques de l'Institut fédéral d'évaluation des risques, Allemagne (BfR), de l'Université technique du Danemark - Institut national de l'alimentation, Danemark (DTU), de l'Institut national néerlandais pour la santé publique et l'environnement, Pays-Bas (RIVM) et de l'Autorité européenne de sécurité des aliments (Efsa). Cette réunion a été l'occasion d'échanger pour la première fois sur les pratiques en matière de pharmacocinétique tant sur les approches que sur les outils, mais aussi sur les futurs axes qui devraient permettre des collaborations. Cet atelier a été conclu par la constitution d'un groupe inter-agence, qui a pour ambition de gagner en efficacité et en harmonisation sur l'utilisation du modèle PBPK dans le cadre de l'évaluation du risque. L'atelier a permis également de renforcer le réseau des cinéticiens de l'Anses (RCA) au sein de la transversalité « Exposition et Toxicologie des contaminants chimiques ».

Le projet européen « EFFORT : Ecology from Farm to Fork Of microbial drug Resistance and Transmission » s'est conclu fin novembre. Les Laboratoires de Fougères, de Maisons-Alfort et de Ploufragan-Plouzané-Niort ont contribué à plusieurs tâches et le Laboratoire de Fougères a piloté celle concernant les interventions en élevage en partenariat avec l'unité Épidémiologie à Ploufragan. Le programme a permis une étude épidémiologique portant sur les relations entre l'utilisation des antibiotiques, la biosécurité et le bien être animal et la résistance aux antibiotiques observée chez *E. coli* et au sein du microbiote intestinal des animaux par des méthodes moléculaires (qPCR, métagénomique). Pour les productions porcines et de poulets de chair, des groupes de vingt élevages par pays ont été étudiés dans neuf pays européens. L'Anses a également contribué à des études chez le veau, la dinde et la truite, menées selon les mêmes modalités dans trois pays. Les études d'intervention menées en élevage porcin (deux pays) et de poulets de chair (trois pays) ont évalué l'évolution de l'utilisation des antibiotiques dans des élevages, dans le cadre d'un programme d'intervention piloté par les vétérinaires. Le projet a généré un ensemble de données originales de grande qualité qui ont conduit à une première caractérisation par métagénomique de la diversité du résistome en productions porcine et avicole, à l'étude de la relation entre usage, biosécurité et résistance aux antibiotiques. Les travaux menés nécessiteront encore plusieurs mois de travail pour leur valorisation scientifique, ce qui n'a pas empêché la présentation des principaux résultats lors de la conférence finale fin novembre 2018 à Utrecht (Pays-Bas) (<http://www.effort-against-amr.eu>)



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)