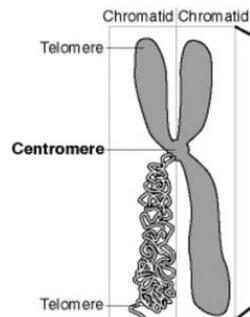
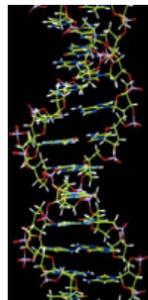
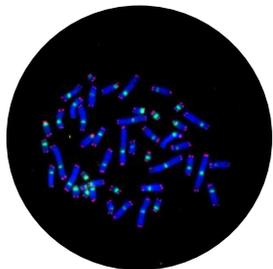
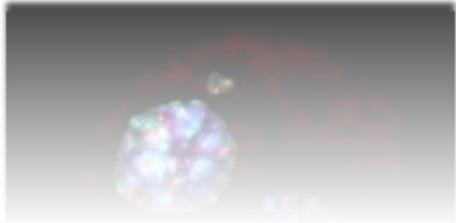
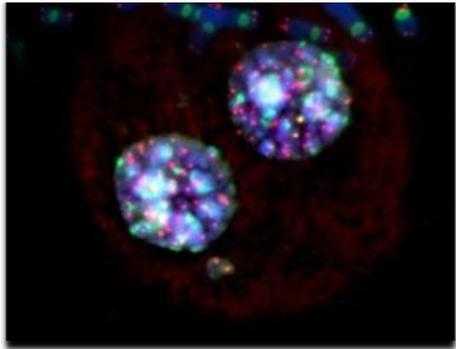
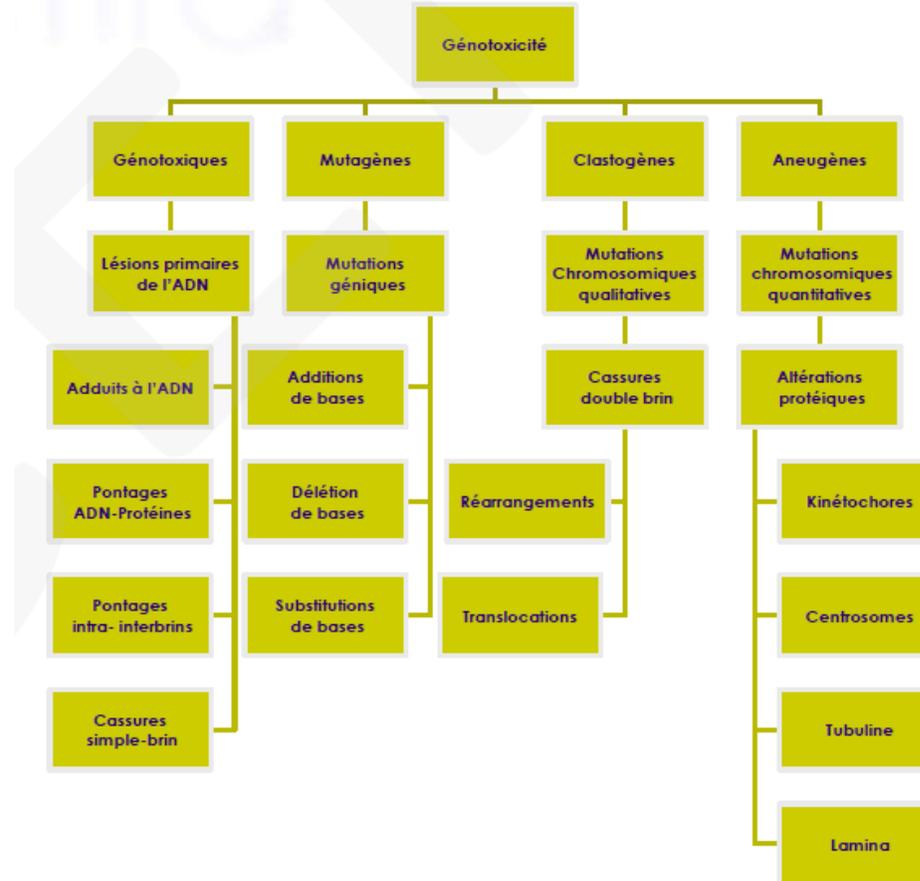


Comment contrôler la présence d'impuretés génotoxiques et de perturbateurs endocriniens dans les eaux, Innovations et perspectives



Introduction

Impuretés génotoxiques : substances chimiques qui peuvent endommager l'ADN et provoquer des mutations. Elles sont souvent associées à un risque accru de cancer



Introduction

Perturbateurs endocriniens : substances qui interfèrent avec le système hormonal, pouvant affecter la reproduction, le développement et d'autres fonctions corporelles.



Le système endocrinien contrôle, par les hormones, le développement des organes et leurs activités, la reproduction et le comportement.

Les perturbateurs endocriniens sont des produits rémanents, persistant dans l'environnement, dans le vivant, qui s'accumulent dans les chaînes alimentaires (bioaccumulables)

Les perturbateurs endocriniens peuvent agir à long terme (parfois des décennies), à très faibles doses (comme les hormones).

Les perturbateurs endocriniens peuvent chez l'homme, par l'intermédiaire de la nourriture et de l'eau de boisson, s'accumuler progressivement, porter atteinte à la fertilité masculine ou féminine, au développement d'organes (avec malformations à la naissance, notamment des organes génitaux) et favoriser des cancers, surtout des organes cibles : cancers des testicules, de la prostate, du sein, des ovaires, de la thyroïde.

Le rôle des perturbateurs endocriniens est particulièrement préoccupant durant le développement du fœtus, notamment au cours de la phase d'organogénèse

Sources de Contamination

- **Impuretés génotoxiques :**
 - **Industries** : Émissions de substances toxiques lors de la fabrication de produits chimiques, de plastiques ou de métaux.
 - **Agriculture** : Utilisation de pesticides et d'herbicides qui peuvent se retrouver dans les eaux de surface et souterraines.
 - **Déchets** : Décharges illégales ou mal gérées qui relâchent des contaminants dans le sol et les eaux.

Sources de Contamination

- **Perturbateurs endocriniens :**
 - **Produits pharmaceutiques :** Excrétion de médicaments non métabolisés par les humains qui se retrouvent dans les eaux usées.
 - **Cosmétiques et produits ménagers :** Contiennent souvent des phtalates et d'autres produits chimiques qui persistent dans l'environnement.
 - **Plastiques :** Libération de substances comme le bisphénol A (BPA) lors de la dégradation des plastiques.

Méthodes de Détection

- **Techniques analytiques par chromatographie :**
 - **HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) :** Utilisée pour séparer les composés dans un échantillon d'eau.
 - **GC-MS (Gas Chromatography-Mass Spectrometry) :** Permet d'identifier et de quantifier les contaminants volatiles.

Ces méthodes peuvent être limitatives pour la détection de quantités aussi faibles (< 1 ng/L) et les effets additifs des différents composés hormonaux actifs observés ne peuvent être identifiés.

Avec des tests cellulaires in vitro, de très faibles concentrations de produits chimiques ainsi que l'effet additif de différentes hormones avec un mode d'action identique peuvent être détectés.

Méthodes de Détection

- **Tests in vitro de screening :**
 - **Impuretés génotoxiques :**
 - **Ames test :** Évalue la mutagénicité d'un composé en observant s'il induit des mutations dans des souches de bactéries.
 - **Test de micronoyaux :** Utilisé pour détecter des dommages à l'ADN dans des cellules eucaryotes, fournissant un indicateur de génotoxicité.
 - **Perturbateurs endocriniens :**
 - **Test Yes/Yas :** Test de screening pour détecter les produits chimiques perturbateurs endocriniens par l'utilisation de souches de levures modifiées avec incorporation d'un gène rapporteur et du gène du récepteur de l'œstrogène humain (YES) ou de l'androgène humain (YAS).

Test d'Ames (mutagénicité)

CELLULES CIBLES: *Salmonella typhimurium* ou *Escherichia coli* (5 souches au moins)



AUXOTROPHE POUR L' HISTIDINE (HIS-) [mutants sélectionnés par Ames, sans histidine les souches ne poussent pas]



MUTATION REVERSE



AGENTS MUTAGÈNES
+/-MÉTABOLISME



PROTOTROPHE POUR L' HISTIDINE (HIS+), [mutation => retour à l'état sauvage]

S9, fraction microsomale de foie (animaux traités à l'aroclor1254)
centrifugation à 9000g, mélange à des cofacteurs enzymatiques G6P, NADP, Mg₂Cl etc,
⇒Présence de plusieurs des isoformes de cytochromes P450
⇒MÉTABOLISATION, détecte les pro-mutagènes

Test d'Ames (mutagénicité)

Screening AMES à haut débit avec une quantité très limitée d'élément de test : plus rapide et moins cher

- **Ames MPF** lorsqu'une petite quantité (100 mg) de l'élément d'essai est disponible (Salmonella typhimurium et/ou E. Coli : 5 souches, +/- activation métabolique) dans **une plaque à 384 puits (liquide)**
- **Mini Ames** lorsqu'une petite quantité (50 mg) de l'élément d'essai est disponible (Salmonella typhimurium et/ou E. Coli : 5 souches, +/- activation métabolique) dans **une plaque à 25 puits (agar)**
- **Nano Ames™** lorsqu'une très petite quantité (50 µg) de l'élément d'essai est disponible ou lorsque le composé est isolé par chromatographie semi-préparatoire (Salmonella typhimurium et/ou E. Coli : 5 souches, +/- activation métabolique)

AMES Treat & Wash (250 mg) pour protéines naturelles ou synthétisées, mélanges interférents complexes, extraits de plantes (présence de flavonoïdes), antibiotiques ou composés cytotoxiques (oncologiques)

Test du MicroNoyau (cytogénicité)

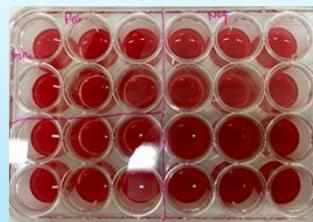
MicroNucleus in vitro par miniaturisation : plus rapide et moins cher

Pour dossier réglementaire

Méthode standard
Conforme aux BPL (1 g)

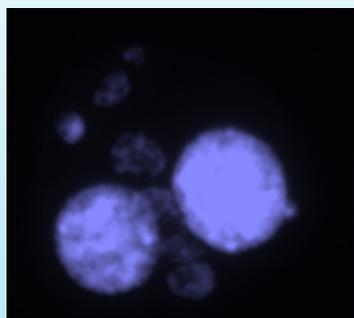
Pour la recherche, le développement ou si peu de matériaux disponibles

Non GLP Miniaturisation method (80 mg)

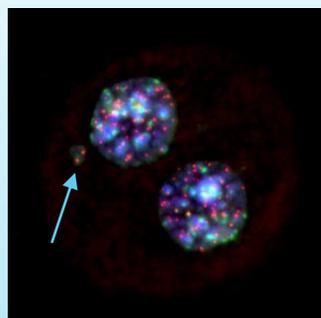


Analyse semi-automatisée à l'aide du logiciel Metafer pour la présence de micronoyaux. Analyse de 2000 cellules par lame, 2 lames par culture, 2 cultures par concentration (soit 8000 cellules analysées/concentration).

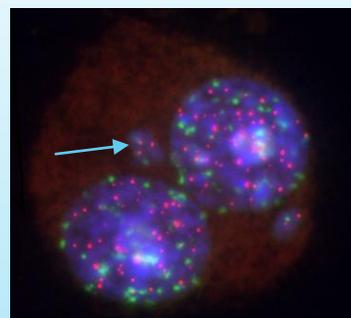
MicroNucleus in vitro avec coloration unique des télomères et des centromères pour l'aneuploïdie (OCDE 487) : test unique sur le marché



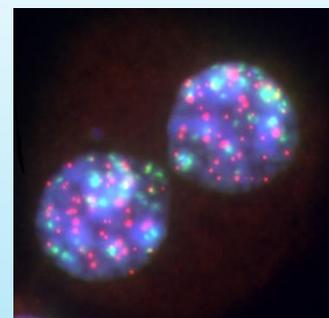
MN without Q-FISH coloration



MN with only telomere (red) sequences :
clastogen

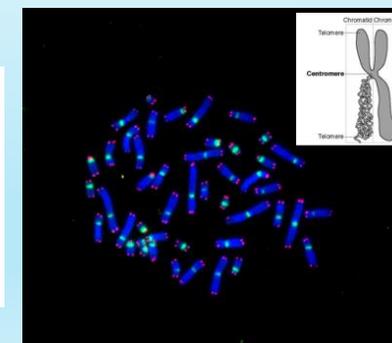
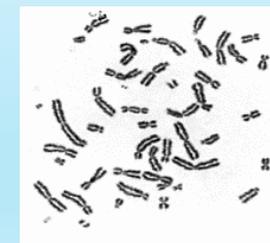


MN with telomere and centromere (green) sequences:
aneugen



MN without telomere and centromere sequences

Chromosomal Aberration on Human Lymphocytes Whole Blood with telomere & centromere staining (OECD 473)

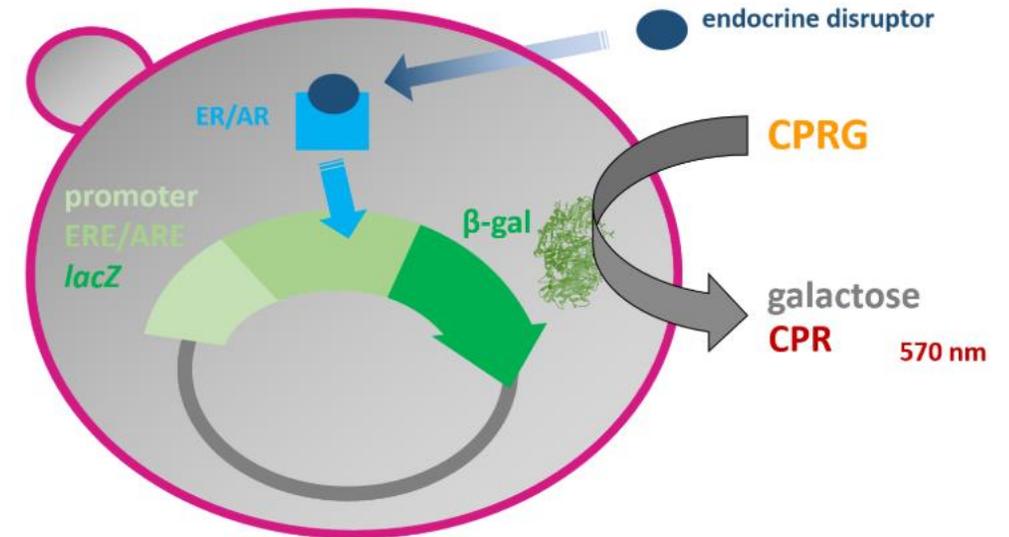


Xenoscreen Yes/Yas (perturbateurs endocriniens)

Le test in vitro basé sur la levure comprend deux souches de levure, nommées YES (Yeast Estrogen Screen) et YAS (Yeast Androgen Screen). Ces souches ont été générées et comprennent un gène rapporteur et le gène du récepteur de l'œstrogène humain (YES) ou de l'androgène humain (YAS). En présence de perturbateurs endocriniens (agonistes ou antagonistes), ces cellules vont activer la transcription et synthétiser la β -galactosidase.

Le potentiel perturbateur endocrinien des œstrogènes et des androgènes d'un échantillon de test est évalué en exposant ces cellules de levure à des concentrations variables d'échantillon et en observant la conversion d'un substrat chromogène. Les perturbateurs endocriniens interagissent avec le récepteur (récepteur des œstrogènes ou des androgènes) et entraînent une altération de l'expression de la β -galactosidase. La comparaison du développement des couleurs à l'aide d'un lecteur de plaques à deux longueurs d'onde permettra une évaluation sensible et quantitative des propriétés perturbatrices endocriniennes de l'échantillon.

Receptor Transcriptional Activation Assay YES YAS



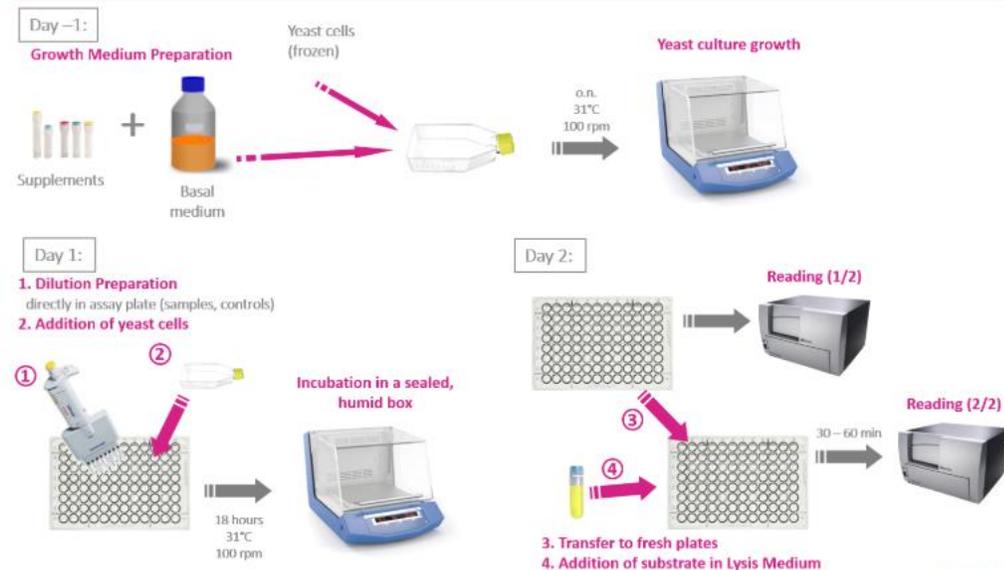
Xenoscreen Yes/Yas (perturbateurs endocriniens)

XenoScreen XL (Xtra Lyticase) YES/YAS – Description du dosage des perturbateurs endocriniens avec des souches de levure

Dans le test d'activation transcriptionnelle du récepteur, les cellules YES (Yeast Estrogen Screen) et YAS (Yeast Androgen Screen) sont exposées à 8 concentrations d'un échantillon de test, ainsi qu'à un contrôle positif et à un contrôle négatif, pendant 18 heures (XenoScreen XL YES YAS). Après exposition, l'expression de la β -galactosidase est évaluée via un substrat chromogène. Chaque dose est testée en double exemplaire pour permettre l'analyse statistique des données.

Une augmentation ou une diminution significative du développement de la couleur par rapport au témoin négatif correspondant lors de l'exposition indique que l'échantillon agit comme un perturbateur endocrinien. La comparaison avec des témoins positifs standardisés (testés à doses multiples) permet de quantifier les propriétés perturbatrices endocriniennes (EC10, EC50 of EEQ/AEQ).

XenoScreen XL (Xtra Lyticase) YES YAS



Conclusion et Perspectives

- **Importance d'une surveillance continue** : La détection précoce et le contrôle des contaminants sont cruciaux pour la santé publique et la préservation de l'environnement.

Conclusion et Perspectives

Innovation technologique : Couplage HPLC-NanoAmes

Les dosages biologiques fournissent des informations importantes pour l'évaluation de l'innocuité des impuretés. Cependant, des substances très sensibles sont nécessaires pour détecter des substances génotoxiques inférieures à un seuil de $0,00015 \mu\text{/mL}$ (TTC). Le couplage à la biologie moléculaire offre de nouvelles possibilités technologique détection par biologie moléculaire.

FOOD ADDITIVES & CONTAMINANTS: PART A
<https://doi.org/10.1080/19440049.2019.1664772>



OPEN ACCESS Check for updates

Value and limitation of *in vitro* bioassays to support the application of the threshold of toxicological concern to prioritise unidentified chemicals in food contact materials

Benoit Schilter^a, Karin Burnett^b, Chantra Eskes^c, Lucie Geurts^d, Mélanie Jacquet^e, Christian Kirchnawy^f, Peter Oldring^g, Gabriele Pieper^h, Elisabeth Pinterⁱ, Manfred Tacker^j, Heinz Traussnig^k, Peter Van Herwijnen^l and Alan Boobis^m

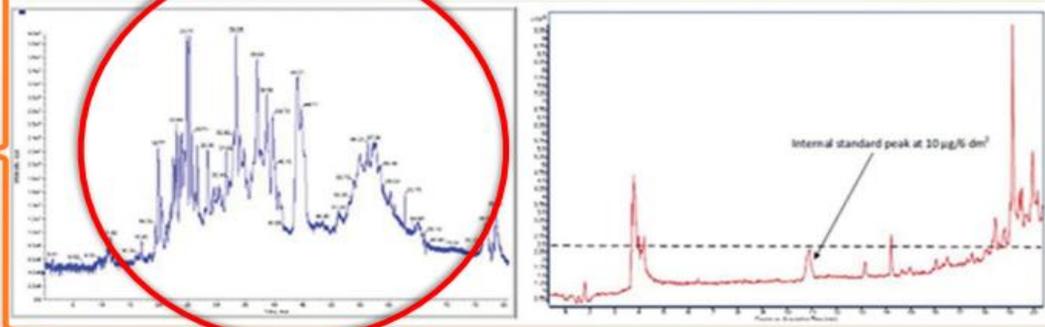
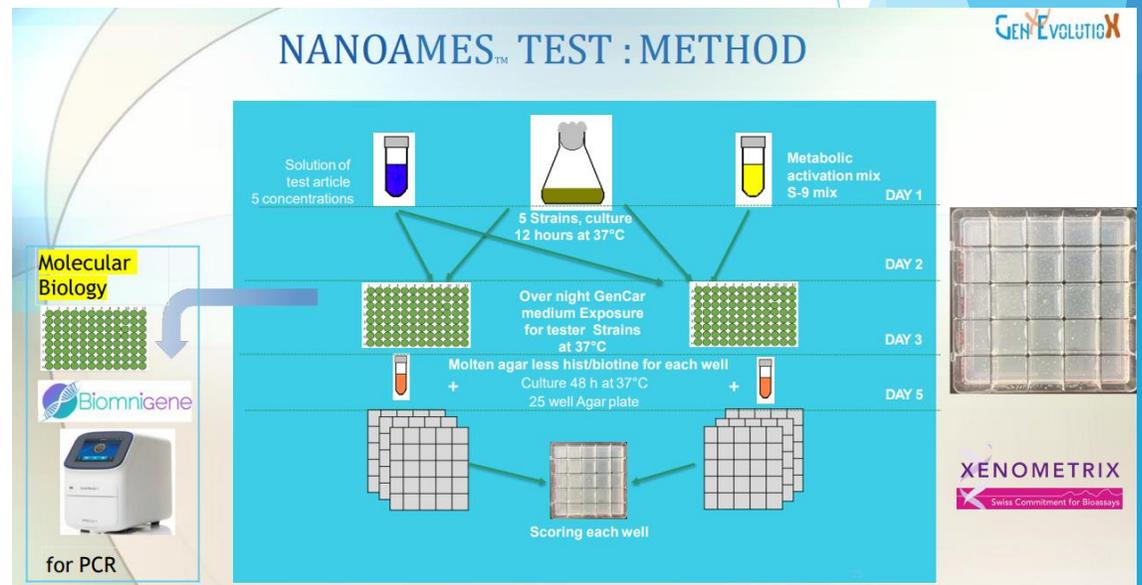


Figure 1. Illustrative examples of forests of peaks. Total ion chromatograms of extracts from FCMs are presented, along with a line (dashed) representing a $10 \mu\text{g}/6 \text{ dm}^2$ standard (right-hand panel). Such profiles are typical from many different FCM extracts or migrates.





Dr Gautier Decock, General Manager

Gautier.Decock@genevolution.fr

+33.6.27.02.73.84

Isabelle Mouche, President

Isabelle.Mouche@genevolution.fr

+33.6.87.86.42.06

Merci
Thank you
감사 해요

CONFIDENTIAL DOCUMENT

