Extraction d'éléments traces métalliques à partir de pains libanais et évaluation du danger de ces mélanges

Isabelle Séverin, N. Lebbos, Elias Bou-Maroun, C. Daou, R. Ouaini, H. Chebib, M. Afram, Pierre Curmi, Marie-Christine Chagnon

▶ **To cite this version:**

Isabelle Séverin, N. Lebbos, Elias Bou-Maroun, C. Daou, R. Ouaini, et al.. Extraction d'éléments traces métalliques à partir de pains libanais et évaluation du danger de ces mélanges. SFT 2018, 2018, Dijon, France. hal-01986057

HAL Id: hal-01986057

https://institut-agro-dijon.hal.science/hal-01986057

Submitted on 18 Jan 2019

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.

Extraction d'éléments traces métalliques à partir de pains libanais et évaluation du danger de ces mélanges

I. Severin[1], N. Lebbos[2], E. Bou-Maroun[3], C. Daou[4], R. Ouaini[4], H. Chebib[4], M. Afram[2], P. Curmi[5] and M-C. Chagnon[1]

[1] Nutrition, Physiology and Toxicology Laboratory (NUTOX), INSERM U1231, Univ. Bourgogne Franche-Comté (UBFC), AgroSup Dijon, 1 Esplanade Erasme, F-21000 Dijon, France, [2] Lebanese Agricultural Research Institute, Heavy Metals department, Beirut, Lebanon, [3] Univ. Bourgogne Franche-Comté, AgroSup Dijon, PAM UMR A 02.102, Procédés Alimentaires et Microbiologiques, 1 Esplanade Erasme, F-21000 Dijon, France, [4] Lebanese University, Faculty of Science II, Laboratoire d'Analyse Chimique, FANAR, Lebanon, [5] AgroSupDijon, Univ. Bourgogne Franche Comté, Biogéosciences UMR 6282, Dijon, France.

Introduction

Parmi les éléments traces métalliques (ETM) qui peuvent être présents dans les aliments, certains sont connus comme étant toxiques et doivent faire l'objet d'une surveillance accrue. En ce qui concerne la sécurité sanitaire, il semble pertinent d'étudier le cas du pain, qui représente une part majoritaire de la ration journalière de la population libanaise. Dans une étude précédente, l'Institut de Recherche sur l'Agriculture Libanaise (IRAL) a déterminé la présence de plusieurs ETM (arsenic, cadmium, cobalt, chrome, mercure, nickel et plomb) dans le pain libanais. Bien que la toxicité de chaque ETM soit connue individuellement, il est important de tester la toxicité de ce mélange d'ETM, présents dans le pain, afin de vérifier la présence d'effets « cocktail », notamment synergiques.

Matériels et méthodes

Préparation des échantillons

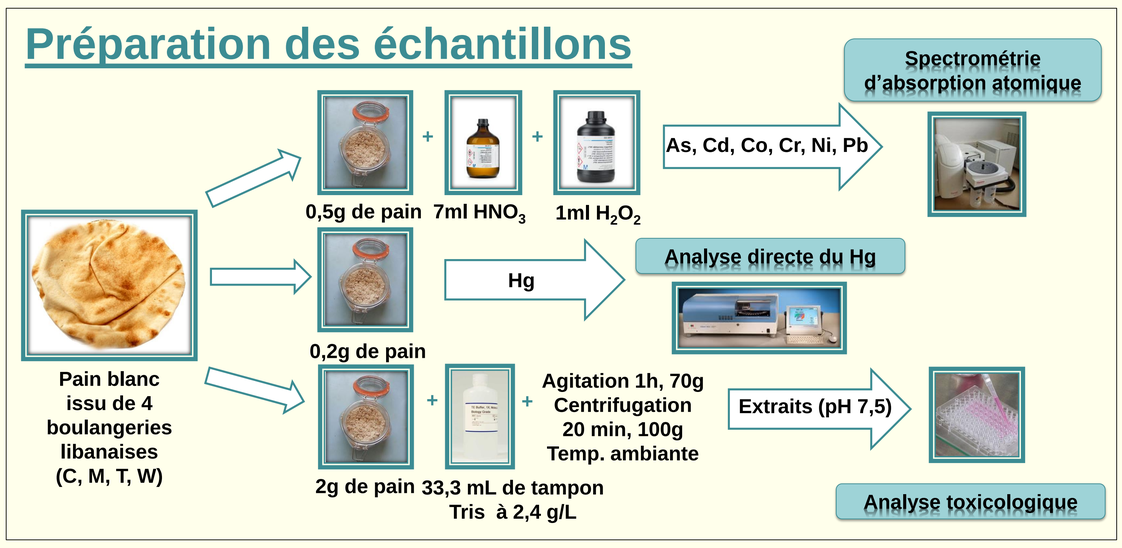


Figure 1 : Préparations des échantillons pour analyses chimique et toxicologique des ETM (As, Cd, Co, Cr, Ni, Pb and Hg) à partir de pain blanc libanais.

Modèle cellulaire

Lignée cellulaire hépatique HepG2, d'origine humaine, ayant gardé des capacités de métabolisation et une protéine P53 fonctionnelle.[1]

Cytotoxicité

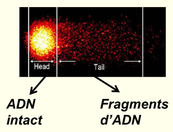
Test détectant la viabilité cellulaire après 2h d'incubation et métabolisation par les activités enzymatiques mitochondriales de la résazurine bleue, non fluorescente en résorufine rose , fluorescente.[2]

Stress oxydatif

Test détectant la présence d'Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO) grâce à l'utilisation de 2',7'- hydrofluorescein diacetate (H_2DCFDA), non fluorescent, qui devient fluorescent après métabolisation en présence d'ERO.[3]

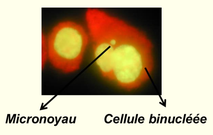
Génotoxicité

- Test des comètes



Test détectant les cassures simples et doubles brins d'ADN ainsi que les sites alcali-labiles après une électrophorèse en conditions alcalines (pH = 13) et coloration de l'ADN avec un agent intercalant fluorescent (iodure de propidium).[4]

- Test du micronucleus



Test réalisé, selon la ligne directrice OCDE 487, détectant des micronoyaux dans le cytoplasme de cellules binucléées en interphase. Les micronoyaux peuvent provenir de fragments de chromosomes acentriques ou de chromosomes entiers. La lecture est réalisée au microscope à fluorescence après coloration à l'acridine orange.[5]

- Test d'Ames

Test réalisé, selon la ligne directrice OCDE 471, sur les bactéries *Salmonella typhimurium* TA 98, détectant la présence de mutations géniques[6].

Résultats/Discussion

Tableau 1 : Composition chimique totale en ETM des différents pains (C, M, T, W). N.D. = non déterminé

Métal	Teneur de l'élément dans le pain C (µg/kg)	Teneur de l'élément dans le pain M (µg/kg)	Teneur de l'élément dans le pain T (µg/kg)	Teneur de l'élément dans le pain W (µg/kg)	Teneur maximale permise au Liban (µg/kg) [7]
Ni	N.D.	**1292,14 ± 0,17**	**1539,6 ± 0,07**	364,82 ± 0,02	-
As	321,10 ± 19,81	234,64 ± 21,96	204,3 ± 2,38	399,5 ± 7,13	-
Hg	0,89 ± 0,06	0,73 ± 0,10	0,51 ± 1,66	0,70 ± 0,15	-
Cd	5,77 ± 1,77	6,47 ± 0,27	7,33 ± 0,01	8,69 ± 1,79	200
Co	84,24 ± 2,04	91,09 ± 2,93	87,2 ± 0,05	86,70 ± 4,62	-
Cr	**362,76 ± 10,18**	40,37 ± 2,17	46,84 ± 13,6	15,53 ± 1,58	-
Pb	**259,10 ± 6,97**	73,98 ± 4,60	**214,99 ± 7,18**	**203,13 ± 30,38**	200

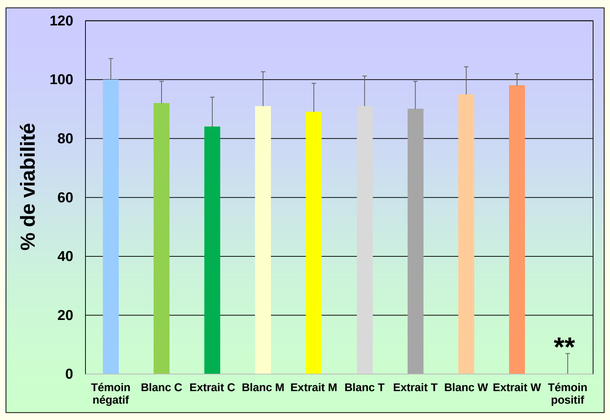


Figure 2 : Viabilité cellulaire déterminée avec le test à la résazurine après 24h d'exposition des cellules HepG2 aux différents extraits. ** P < 0,01, significativement différent du témoin négatif. Témoin positif : Sodium Dodécyl Sulfate 3% (m/v) (3 expériences indépendantes. Valeur brute du témoin négatif : 3 923 571.

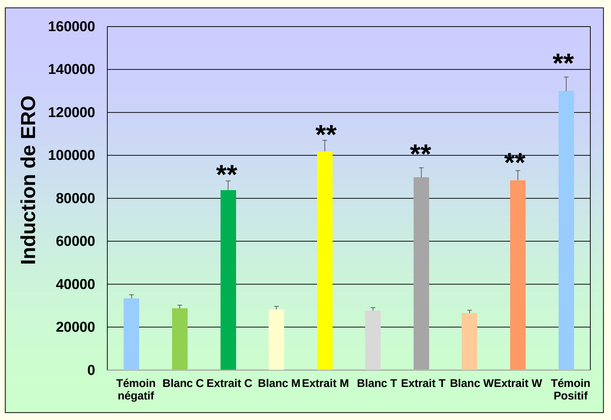


Figure 3 : Stress oxydant déterminé avec le test au DCFDA après 24h d'exposition des cellules HepG2 aux différents extraits. ** P < 0,01, significativement différent du témoin négatif. Témoin positif : Tert-butyle hydroperoxide à 15 µM (3 expériences indépendantes). Valeur brute du témoin négatif : 33 400.

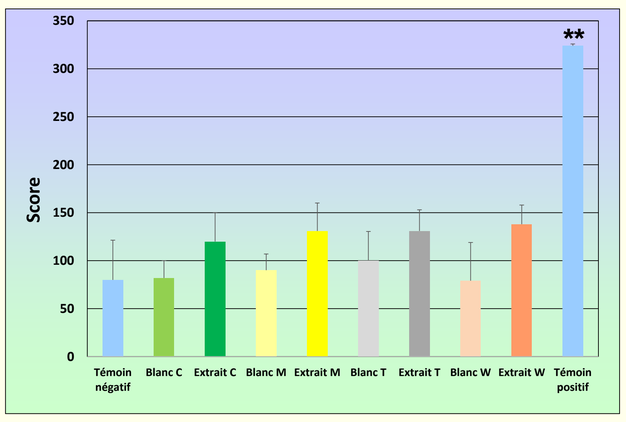


Figure 4 : Dommages à l'ADN déterminés avec le test des comètes après 24h d'exposition des cellules HepG2 aux différents extraits. ** P < 0,01, significativement différent du témoin négatif. Témoin positif : Méthylmétanesulfonate à 50 µM (3 expériences indépendantes). Score du témoin négatif : 80/400 (score maximal).
Score = (0x%cellules en classe 0) + (1x%cellules en classe 1) + (2x%cellules en classe 2) + (3x%cellules en classe 3) + (4x%cellules en classe 4)

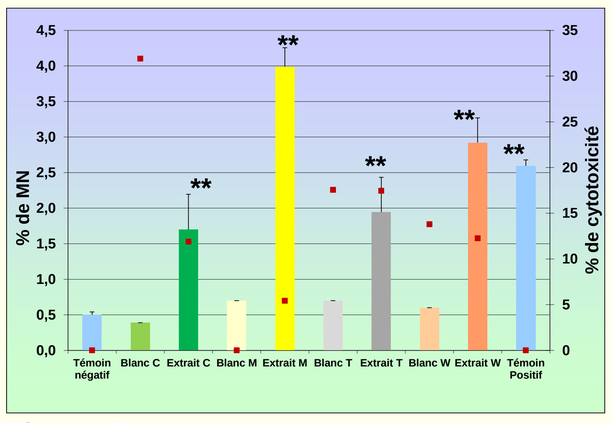


Figure 5 : Dommages chromosomiques et génomiques déterminés avec le test du micronoyau après 44h d'exposition des cellules HepG2 aux différents extraits. ** P < 0,01, significativement différent du témoin négatif. Témoin positif : vinblastine sulfate à 0,625 ng/ml (1 expérience). Valeur brute du témoin négatif : 10 micronoyaux/2000 cellules binucléées.

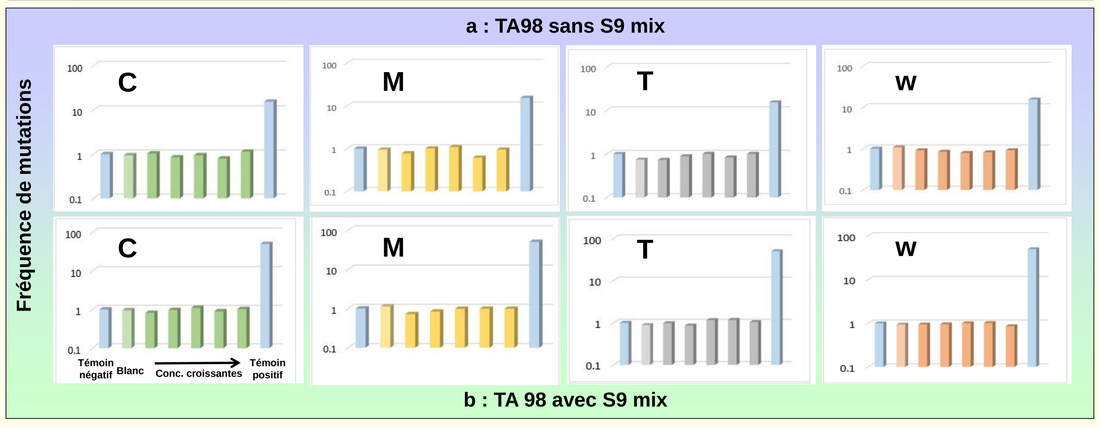


Figure 6 : Fréquences de mutations obtenues dans le test d'Ames réalisé sur la souche TA 98 en absence (a) et en présence (b) de S9 mix avec les extraits de pain à des concentrations comprises entre 12,5 et 200 µg/mL (une expérience indépendante). Témoins positifs : 2-Nitrofluorène (2 µg/boite) en absence de S9 mix, 2-Aminoanthracène (2,5 µg/boite) en présence de S9 mix.

- **Aucun des extraits, issus de 4 boulangeries différentes, ne présente de cytotoxicité (Fig. 2) mais ils induisent tous une réponse positive dans le test DCFDA (x4,5 en moyenne), indiquant la présence d'ERO (Fig. 3) après 24h d'exposition.**
- **Cet effet ne semble pas entrainer une augmentation des cassures de l'ADN puisque le test des comètes est négatif (Fig. 4), ceci même, en présence de l'enzyme fpg détectant spécifiquement les dommages oxydatifs (données non présentées).**
- **Par contre, le test du micronoyau montre une augmentation significative (x3,4 à 8) du nombre de cassures et/ou pertes de chromosomes dans les 4 extraits (Fig. 5), notamment pour l'extrait M, qui a une teneur élevée en Nickel (1,29 mg/kg).**
- **Le test d'Ames permettant de mettre en évidence des mutations géniques s'est révélé négatif avec la souche TA 98 (Fig. 6) et avec la souche TA 100 (données non présentées), en absence ou en présence d'un système de métabolisation exogène (S9 mix).**
- **L'analyse chimique (Tableau 1) indique une composition variable des pains selon leurs origines de fabrication :**
  - **un niveau très élevé de Nickel (1292 µg/kg) dans les pains fabriqués par les boulangeries M et T,**
  - **un taux de Chrome plus important (362 µg/kg) pour le pain C,**
  - **du Plomb dans les pains C, T et W à des concentrations de 259, 215 et 203 µg/kg respectivement, proches de la limite autorisée au Liban.**
  - **du Cadmium à des taux compris entre 5,77 et 8,69 µg/kg, soit plus de 20 fois inférieurs à la norme libanaise.**

Conclusion

Les extraits de pain de 4 boulangeries libanaises induisent un stress oxydatif menant à des dommages chromosomiques (résultat à confirmer). Chaque extrait va être testé à différentes concentrations pour mettre en évidence des effets-doses. Les ETM quantifiés chimiquement vont être évalués individuellement aux concentrations retrouvées dans les extraits pour vérifier l'impact de ces ETM sur l'effet global observé, afin de mettre en évidence d'éventuelles interactions.

Références : 1) Gerets *et al.* (2012) Cell Biol Toxicol 28, 69-87 2) Binderup *et al.* (2002) Food Addit. Contam. 19, 13-28, 3) Souton, Thèse doctorat (2017), 4) Riquet *et al.* (2016) Food Chem. 199, 59-69, 5) OCDE 487, 6) OCDE 471, 7) Norme libanaise NL 240 (2010). 13 pp.