

anses

agence nationale de sécurité sanitaire
alimentation, environnement, travail



Connaître, évaluer, protéger

Valeurs toxicologiques de référence

La cylindrospermopsine

Avis de l'Anses
Rapport d'expertise collective

Janvier 2019 - Édition scientifique

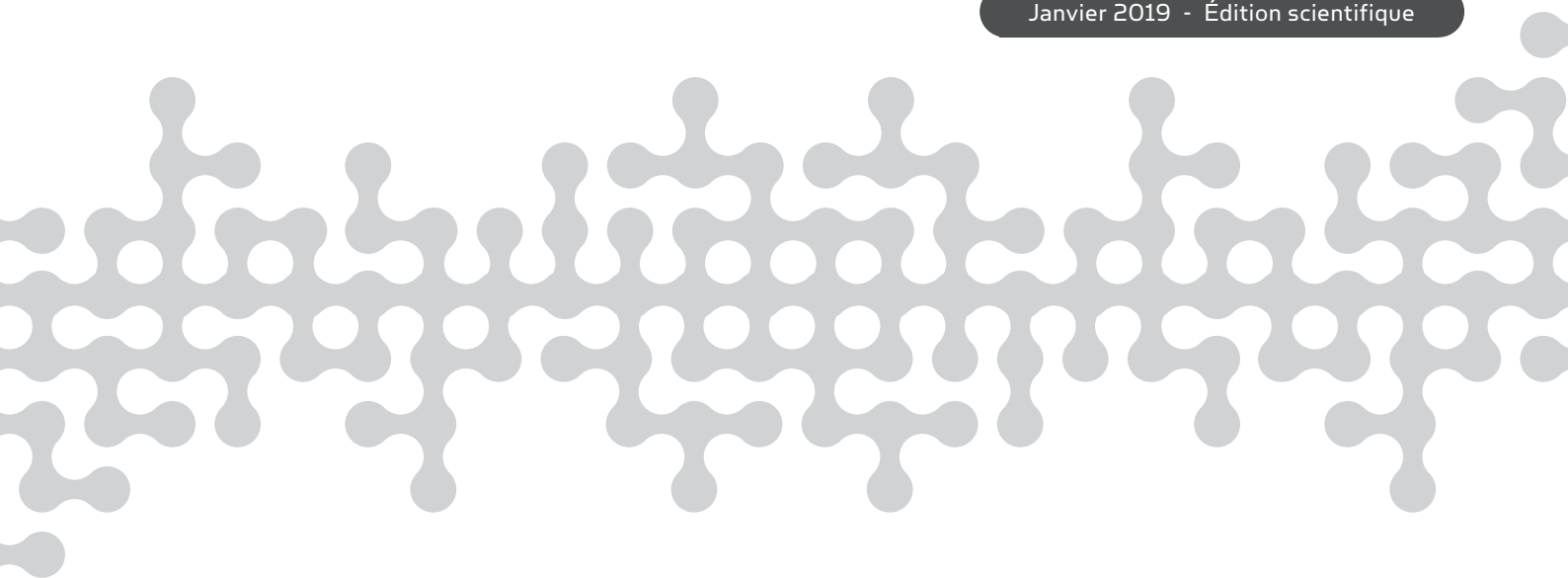


Valeurs toxicologiques de référence

La cylindrospermopsine

Avis de l'Anses
Rapport d'expertise collective

Janvier 2019 - Édition scientifique



Le directeur général

Maisons-Alfort, le 7 janvier 2019

AVIS
de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation,
de l'environnement et du travail

relatif à la proposition de VTR subchronique par voie orale pour la cylindrospermopsine
(CAS n°143545-90-8)

L'Anses met en œuvre une expertise scientifique indépendante et pluraliste.

L'Anses contribue principalement à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'environnement, du travail et de l'alimentation et à évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.

Elle contribue également à assurer d'une part la protection de la santé et du bien-être des animaux et de la santé des végétaux et d'autre part à l'évaluation des propriétés nutritionnelles des aliments.

Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui scientifique technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L.1313-1 du code de la santé publique).

Ses avis sont publiés sur son site internet.

L'Anses a été saisie le 19 juillet 2016 par la Direction générale de la santé (DGS) afin d'actualiser ses travaux relatifs à l'évaluation des risques liés à la présence de cyanobactéries et de leurs toxines dans les eaux destinées à la consommation humaine (EDCH), à la baignade et autres activités récréatives.

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

Dans le cadre de l'instruction de la saisine portant sur l'évaluation des risques liés à la présence de cyanobactéries et de leurs toxines dans les eaux destinées à la consommation humaine (EDCH), à la baignade et autres activités récréatives il est apparu nécessaire d'actualiser le corpus documentaire relatif à la toxicité des cyanotoxines.

Deux toxines ont été identifiées par les experts comme nécessitant un travail spécifique. Compte tenu de sa mission pérenne en matière d'élaboration de valeurs toxicologiques de référence (VTR), et afin de répondre aux termes de cette saisine, l'Anses a décidé de procéder à l'élaboration d'une VTR pour ces deux toxines : la cylindrospermopsine (CAS n°143545-90-8) [désignée CYN dans la suite de cet avis] et la microcystine-LR (CAS n°101043-37-2). C'est dans la même logique de mission pérenne que le résultat de ce travail est publié dans le cadre de deux avis distincts et spécifiques de l'Agence.

Le présent avis a donc pour objet de produire une proposition de VTR subchronique par voie orale pour la cylindrospermopsine (CYN), toxine qui reste encore peu étudiée. La VTR sera reprise et

utilisée au cours de l'expertise de l'Agence portant plus globalement sur les risques sanitaire liés à la présence de cyanobactéries (saisine 2016-SA-0165).

Une VTR est un indice toxicologique qui permet de qualifier ou de quantifier un risque pour la santé humaine. Elle établit le lien entre une exposition à une substance toxique et l'occurrence d'un effet sanitaire indésirable. Les VTR sont spécifiques d'une durée d'exposition (aiguë, subchronique ou chronique) et d'une voie d'exposition (orale ou respiratoire). La construction des VTR diffère en fonction des connaissances ou des hypothèses formulées sur les mécanismes d'action des substances. Actuellement, l'hypothèse par défaut est de considérer une relation monotone entre l'exposition, ou la dose, et l'effet, ou la réponse. En l'état actuel des connaissances et par défaut, on considère généralement que, pour les effets non cancérogènes, la toxicité ne s'exprime qu'au-delà d'un seuil de dose (Anses, 2017).

En pratique, la construction de la VTR comprend les étapes suivantes :

- recenser et analyser les données de toxicité disponibles, sur la base d'études épidémiologiques et/ou expérimentales ;
- identifier le ou les organes cibles et l'effet critique ;
- identifier l'hypothèse de construction, à seuil ou sans seuil de dose, en fonction du mode d'action de la substance ;
- choisir une étude clé de bonne qualité scientifique permettant généralement d'établir une relation dose – réponse ;
- définir une dose critique chez l'Homme ou l'animal à partir de cette étude, éventuellement dans le cas d'une dose critique obtenue chez l'animal, ajuster cette dose à l'Homme ;
- pour une VTR à seuil, appliquer des facteurs d'incertitude à cette dose critique de manière à dériver une VTR applicable à l'ensemble de la population concernée ;
- pour une VTR sans seuil, réaliser une extrapolation linéaire à l'origine afin de déterminer un excès de risque unitaire.

L'élaboration des VTR suit une approche très structurée et exigeante qui implique des évaluations collectives par des groupes de spécialistes.

Une recherche bibliographique effectuée via les bases de données Scopus et Pubmed sans restriction de date, a permis d'identifier 2000 articles relatifs à la toxicité de la CYN. Parmi ces études, trois ont été jugées pertinentes par les experts pour la construction d'une VTR subchronique par voie orale, et une seule a conduit à la construction d'une valeur toxicologique de référence (VTR) représentatives de scénarios d'exposition liés à l'ingestion d'EDCH ou d'eau pendant les activités aquatiques récréatives. Une VTR subchronique par voie orale liée à l'ingestion de CYN est proposée dans le présent avis.

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) ».

L'expertise collective a été réalisée par le comité d'experts spécialisé (CES) « Valeurs sanitaires de référence ». Les travaux ont été présentés au CES tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques. Deux rapporteurs ont été nommés, le premier pour évaluer les études toxicologiques relatives au statut génotoxique de la CYN et le second pour évaluer les études éligibles à la construction d'une VTR subchronique par voie orale. Les travaux ont été adoptés par le CES « Valeurs sanitaires de référence » réuni le 18 octobre 2018.

L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise.

Les déclarations d'intérêts des experts sont publiées sur le site internet du ministère en charge des solidarités et de la santé (<https://dpi.sante.gouv.fr>).

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU CES

■ Synthèse des données toxicologiques

Les seules données toxicologiques relatives à la CYN disponibles à ce jour sont issues d'études réalisées chez l'animal.

- Toxicocinétique

Aucune donnée *in vivo* par voie orale n'a permis de caractériser l'absorption de la CYN après exposition.

Les études dans lesquelles la toxine est administrée par voie orale et qui montrent un effet systémique suggèrent une absorption par le tractus gastro-intestinal (Humpage et Falconer, 2002-2003 ; Sukenik *et al.*, 2006 ; Chernoff *et al.*, 2018). Des études *in vitro* ont montré le passage de la molécule au travers des cellules intestinales humaines Caco-2 mais le mécanisme d'entrée dans ces cellules n'est pas décrit (Fernandez *et al.*, 2014 ; Pichardo *et al.*, 2017).

La CYN, après exposition par voie intrapéritonéale chez le rongeur, a été détectée dans le foie, les reins, le cœur, les poumons, la rate, le sang et la bile. Les plus fortes teneurs ont principalement été détectées dans le foie et les reins (Norris *et al.*, 2001).

La CYN semble métabolisée par le système des cytochromes P450 (Runnegar *et al.*, 1995 ; Shaw *et al.*, 2000 ; Norris *et al.*, 2002 ; Frosco *et al.*, 2003). La présence de métabolites dans les urines de rongeurs exposés a été montrée mais n'ont pas été caractérisés (Norris *et al.*, 2001).

La CYN et ses métabolites semblent être principalement excrétés par l'urine et les fèces au regard des données disponibles par voie intrapéritonéale (Norris *et al.*, 2001).

- Toxicité aiguë et subaiguë

Lors d'une exposition aiguë à la CYN par voie orale, on observe principalement chez le rongeur :

- Des effets hépatiques : cytolyse hépatique, infiltration de cellules inflammatoires et de lipides (Shaw *et al.*, 2000, 2001 ; Bazin *et al.*, 2012) ;
- Des effets rénaux : nécrose tubulaire, altération du tubule proximal, altération des glomérules (Bazin *et al.*, 2012) ;
- Plus rarement, des hémorragies intestinales (Seawright *et al.*, 1999 ; Bazin *et al.*, 2012).

- Irritation et sensibilisation

Une étude unique a montré des effets irritants et sensibilisants suite à une exposition cutanée à la CYN chez la souris (Stewart *et al.*, 2006). Cependant, sur la base d'une seule étude, il n'est pas possible de statuer sur l'effet de la CYN sur l'irritation et la sensibilisation.

- Toxicité subchronique et chronique

Chez le rongeur, la CYN induit principalement :

- des effets rénaux : altération histologiques, altération des tubules proximaux, néphromégalie, (Humpage et Falconer, 2002 Sukenik *et al.*, 2006, Chernoff *et al.*, 2018) ;

- des effets hépatiques : cytolyse hépatique, inflammation, altérations morphologiques et histologiques, hépatomégalie, anomalies de pigmentation (Humpage et Falconer, 2002 Sukenik *et al.*, 2006 Chernoff *et al.*, 2018) ;
- des effets biochimiques : augmentation sérique du taux d'enzymes hépatiques, diminution des taux de cholestérol et de triglycérides (Humpage et Falconer, 2002 ; Chernoff *et al.*, 2018).

- Reprotoxicité et effets sur le développement

Aucune étude *in vivo* par voie orale n'a permis de caractériser les effets de la CYN sur la reproduction et le développement.

L'exposition répétée par voie intrapéritonéale à de faibles doses de CYN (moins de 3 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$) n'a pas montré d'effets sur le développement (Almeida *et al.*, 2013). La forte toxicité maternelle mise en évidence chez des souris gestantes exposées par voie intrapéritonéale à la CYN peut être expliquée par le mode d'administration (Rogers *et al.*, 2007 ; Chernoff *et al.*, 2011).

- Génotoxicité

Sur la base des résultats des tests de génotoxicité (test du micronoyau, test des comètes, test d'Ames, test d'aberration chromosomique, *etc.*), les résultats des études *in vitro* sont en faveur de l'existence d'un effet génotoxique de la CYN ; les résultats *in vivo* restent très parcellaires et une seule étude réalisée par gavage a montré des résultats positifs au niveau du colon sur six organes investigués. Concernant le mode d'action, si un effet aneugène a été décrit, l'induction de lésions de l'ADN a également été observée sans que leur origine n'ait été clairement établie.

- Cancérogénicité

À ce jour, il existe une seule étude préliminaire ayant investigué la cancérogénicité de la CYN chez le rongeur exposé par voie orale (Falconer et Humpage, 2001). Cette étude suggère un effet initiateur de la CYN : l'induction de foyers néoplasiques est observée principalement au niveau du foie. Une étude *in vitro* (Maire *et al.*, 2010) conforte ces observations par la mise en évidence de transformations de la morphologie cellulaire dues au potentiel cancérogène de la CYN à de très faibles doses. Néanmoins, il n'est pas possible de statuer sur l'effet potentiel cancérogène de la CYN, au regard des données disponibles très peu nombreuses. Des études complémentaires sont nécessaires pour caractériser ces effets.

■ Construction d'une VTR subchronique

- Choix de l'effet critique

D'après les études chez le rongeur, les effets les plus sensibles (apparaissant aux doses testées les plus faibles) lors d'une exposition subchronique par voie orale à la CYN sont observés au niveau du foie et des reins. Une augmentation du poids (absolu et/ou relatif) de ces deux organes a été observée à plusieurs reprises (Humpage et Falconer, 2002; Sukenik *et al.*, 2006 ; Chernoff *et al.*, 2018) et a pu être corrélée à une augmentation de certains paramètres biochimiques et de modifications histologiques. Pour le foie, une augmentation des transaminases (ASAT, ALAT) et des phosphatases alcalines a été relevée ainsi que des altérations histologiques (anomalies de pigmentation, altérations et hypertrophie des hépatocytes, inflammation, cytolysse hépatique). Au niveau des reins surviennent des altérations morphologiques et histologiques au niveau des tubules et de la zone médullaire. L'augmentation du poids de ces organes n'est donc pas d'origine adaptative mais semble dégénérative.

Ainsi, le CES considère l'augmentation du poids des organes (foie et reins) comme l'effet critique à retenir pour la construction d'une VTR.

- Analyse des VTR subchroniques existantes

Parmi les VTR existantes (Humpage et Falconer, 2002 ; Afssa-Afsset, 2006 ; US EPA, 2015), le CES estime qu'aucune d'entre elles ne peut être retenue au vu des limites relevées dans l'étude clé utilisée pour construire ces VTR. Dans l'étude menée par Humpage et Falconer (2002), des souris mâles Swiss Albino ont été exposées à 0, 30, 60, 120 ou 240 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ de CYN par gavage quotidien pendant 11 semaines. Les auteurs ont défini une NOAEL de 30 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ basé sur l'augmentation du poids des reins des animaux observée à la dose supérieure.

Cette étude n'a pas été retenue pour les raisons suivantes :

- la dose administrée de la toxine présente des incertitudes au regard du manque d'information sur sa pureté et sur son dosage au cours de l'étude ;
- le caractère de l'effet critique retenu est discutable dans la mesure où il est possible de relier l'augmentation du poids des reins observée à une véritable altération pathologique qu'à partir de la dose la plus élevée de l'étude ;
- les auteurs n'ont pas réalisé leur étude selon les lignes directrices de l'OCDE pour un essai de toxicité subchronique par voie orale (OCDE, 2018), par manque de matériel.

Le CES ne retient donc pas les valeurs existantes et propose de construire une nouvelle VTR subchronique par voie orale basée sur une étude de meilleure qualité.

- Choix de l'étude clé

Les experts du CES retiennent l'étude de Chernoff *et al.* (2018) comme étude clé. Cette étude de 90 jours permet d'évaluer les effets subchroniques par voie orale de la CYN chez des souris CD-1 mâles et femelles gavées quotidiennement à des doses de 0 ; 75 ; 150 ou 300 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ de CYN pure à plus de 95 %. Une LOAEL de 75 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ est établi sur la base de l'augmentation du poids du foie et des reins observée chez le mâle.

- Choix de la dose critique

L'étude de Chernoff *et al.* (2018) permet d'identifier une relation dose-réponse entre l'augmentation du poids relatif du foie chez les mâles et l'exposition à la CYN.

Cette relation dose-réponse a été modélisée à l'aide du logiciel proposé par l'EFSA (EFSA 2017) qui utilise Proast (Proast software version 65,7) élaboré par le RIVM pour construire une Benchmark Dose (BMD).

Les valeurs obtenues issues de cette modélisation n'ont pas pu être retenues en raison de la première dose d'exposition trop éloignée de la dose témoin rendant le modèle obtenu incertain autour des valeurs de BMD. De plus, ces valeurs de BMD se trouvent dans la zone d'extrapolation linéaire du modèle, le rendant encore plus incertain.

Le protocole expérimental de l'étude de Chernoff *et al.* (2018) ne permet pas de définir un NOAEL¹.

La dose critique retenue est donc la plus faible dose testée qui permet d'établir un LOAEL² basé sur l'augmentation du poids des organes (foie et reins).

$$\text{LOAEL} = 75 \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$$

- Ajustement allométrique

¹ NOAEL : no observed adverse effect level (dose maximale n'entraînant pas d'effet néfaste observé)

² LOAEL : lowest observed adverse effect level (dose minimale entraînant un effet néfaste observé)

Pour réduire la valeur de l'incertitude sur la variabilité inter-espèce, un ajustement allométrique a été réalisé. Une dose équivalente humaine (HED = Human Equivalent Dose) est calculée à l'aide de l'équation suivante³ :

$$\text{Dose équivalente Homme} = \text{Dose animal} \times \left(\frac{\text{Poids animal}}{\text{Poids homme}} \right)^{1/4}$$

En l'absence de données moyennes concernant le poids de départ des souris de l'étude, un poids moyen de 25 g a été utilisé, comme préconisé par l'US EPA (US EPA, 2006). Celui utilisé pour l'Homme pour le calcul est de 70 kg.

Soit une dose critique :

$$\text{LOAEL}_{\text{HED}} = 10,31 \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$$

- Choix des facteurs d'incertitude

Le calcul de la VTR à partir de la $\text{LOAEL}_{\text{HED}}$ a été effectué à l'aide des facteurs d'incertitude suivants aboutissant à un **facteur d'incertitude global de 75** :

- Variabilité inter-espèces (UF_A) : 2,5. L'ajustement allométrique réalisé a permis de calculer une dose équivalente humaine, à l'aide de l'équation précédente. Pour tenir compte de la variabilité toxicodynamique et d'incertitudes résiduelles, un facteur d'incertitude supplémentaire a été fixé à 2,5 selon les recommandations de l'IPCS (IPCS, 2005) et sur la base des pratiques de l'Anses.
- Variabilité interindividuelle (UF_H) : 10. Aucune donnée scientifique permettant de réduire la valeur par défaut n'étant disponible, la valeur de 10 est utilisée.
- Usage d'une LOAEL (UF_L) : 3. L'ECHA recommande d'utiliser un facteur de 3 lorsque le LOAEL de l'étude représente la plus faible dose à laquelle l'effet est observé (ECHA, 2012).
- UF_D : 1. Bien que le corpus des données soit quantitativement faible, les études disponibles sont cohérentes et l'effet critique est reproductible.

- Proposition de VTR chronique et niveau de confiance

$$\text{VTR} = \text{LOAEL}_{\text{HED}} / \text{UF} = 0,14 \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$$

- Niveau de confiance

Un niveau de confiance global **moyen** a été attribué à cette VTR en se basant sur les 4 critères suivants : la nature et la qualité du corpus de données (faible), le choix de l'effet critique et le mode d'action (fort), le choix de l'étude clé (fort) et le choix de la dose critique (faible-moyen).

³ Cette équation est issue des recommandations de l'US EPA (US EPA, 2006).

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail adopte les conclusions et recommandations du CES « Valeurs sanitaires de référence » qui portent sur la proposition d'une valeur toxicologique de référence subchronique par voie orale pour la cylindropermopsine (cf. tableau 1).

Pour rappel, dans le cadre des VTR et en lien avec les scénarios généralement pris en compte en évaluation des risques sanitaires chez l'Homme, l'Anses distingue trois types de durée d'exposition :

- les expositions aiguës, de 1 à 14 jours ;
- les expositions subchroniques, de 15 à 364 jours ;
- les expositions chroniques, à partir de 365 jours.

Tableau 1 : VTR subchronique par voie orale pour la cylindropermopsine

Effet critique (étude clé)	Concentration critique	UF	VTR
Augmentation du poids du foie et des reins Chernoff <i>et al.</i> (2018)	LOAEL = 75 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$ <u>Ajustement allométrique</u> LOAEL_{HED} = 10,31 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$	75 UF _A = 2,5 UF _H = 10 UF _L = 3	0,14 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$ Niveau de confiance Moyen

La VTR subchronique par voie orale proposée est associée à un indice de confiance moyen. Il s'agit d'une VTR transitoire susceptible d'être réévaluée si de nouvelles études subchroniques par voie orale devaient être publiées, qui accroîtraient les connaissances sur la toxicité de cylindropermopsine par voie d'ingestion.

Par ailleurs, il n'est actuellement pas possible de statuer sur le potentiel cancérigène de la CYN, du fait des données disponibles très peu nombreuses. Des études complémentaires sont donc nécessaires pour caractériser ces effets. Il en est de même pour le potentiel génotoxique de la CYN.

Dr Roger Genet

MOTS-CLÉS

Valeur toxicologique de référence, VTR, cyanobactéries, cylindrospermopsine, 143545-90-8, orale, subchronique

Toxicological reference value, TRV, cyanobacteria, cylindrospermopsin, 143545-90-8, ingestion, subchronic,

Valeurs toxicologiques de référence (VTR)

Elaboration de VTR subchronique par voie orale pour la cylindrospermopsine

Mission permanente « Valeurs toxicologiques de référence »

Dossier « 2016-SA-0298 »

**Saisines liées « 2001-SA-0035 », « 2015-SA-0206 », « 2015-SA-0207 »,
« 2016-SA-0165 »**

RAPPORT d'expertise collective

Comité d'experts spécialisé

**« Caractérisation des dangers des substances et valeurs toxicologiques de
référence »**

Octobre 2018

Mots clés

Valeur toxicologique de référence, VTR, cyanobactéries, cyndrospermopsine, subchronique, hépatotoxicité

Key words

Toxicological reference value, TRV, cyanobacteria, cyndrospermopsin, subchronic, hepatotoxicity

Présentation des intervenants

PRÉAMBULE : Les experts externes, membres de comités d'experts spécialisés, de groupes de travail ou désignés rapporteurs sont tous nommés à titre personnel, *intuitu personae*, et ne représentent pas leur organisme d'appartenance.

COMITE D'EXPERTS SPÉCIALISÉ

Les travaux, objets du présent rapport ont été suivis et adoptés par le CES suivant :

- CES « Valeurs sanitaires de référence » – 2017-2020

Président

M. Fabrice MICHIELS – Médecin du travail / toxicologue à l'Association Interentreprises pour la Santé au Travail 19 – Compétences : Médecine du travail, toxicologie

Membres

M. Marc BARIL – Professeur associé à l'Université de Montréal – Compétences : Chimiste toxicologue, hygiène industrielle

M. Stéphane BINET – Pharmacien toxicologue à la direction scientifique à l'INRS – Compétences : toxicologie générale et industrielle

Mme Michèle BISSON – Responsable d'étude à l'INERIS – Compétences : Pharmacien toxicologue, toxicologie générale

Mme Anne CHEVALIER – Retraitée de l'Institut de Veille Sanitaire - Compétences : épidémiologie

Mme Fatiha EL-GHISSASSI – Scientifique, Section des Monographies du CIRC (IMO) Centre International de Recherche sur le Cancer - Compétences : biochimie spécialiste en cancérogénèse et génotoxicité

Mme Mounia EL-YAMANI – Responsable d'unité à Santé publique France – Compétences : biochimie, toxicologie

M. Claude EMOND – Professeur adjoint de clinique à l'Université de Montréal – Compétences : Toxicologie, modèle PBPK, toxicocinétique, nanotoxicologie, perturbateurs endocriniens

M. Rex FITZGERALD – Expert en toxicologie réglementaire au Centre Suisse de Toxicologie Humaine Appliquée - Compétences : toxicologie de la reproduction, neurotoxicité du développement, évaluation des risques humains

M. Robert GARNIER – Médecin toxicologue, Centre antipoison de Paris - Compétences : Toxicologie médicale, médecine du travail

Mme Perrine HOET – Professeur à l'Université Catholique de Louvain. IREC – Compétences : médecine, toxicologie industrielle et environnementale

Mme Yuriko IWATSUBO – Médecin épidémiologiste à Santé publique France – Compétences : épidémiologie des risques professionnels

Mme Cécile KAIRO – Évaluateur de risques sanitaires à Santé publique France - Compétences : Docteur en pharmacie spécialisé en environnement, toxicologie générale et évaluation des risques

Mme Laila LAKHAL – Ingénieur INRA unité Toxalim - Compétences : Toxicologie, métabolisme, perturbateurs endocriniens

M. Frédéric LIRUSSI – Maître de Conférences des Universités– Praticien Hospitalier (MCU-PH) à l'UFR des Sciences de Santé & CHU de Dijon - Compétences : Toxicologie Clinique, Toxicologie analytique, Immunité Innée, Reprotoxicité

Mme Anne MAITRE – Professeur des Universités – Praticien Hospitalier (PU-PH) au Laboratoire de Toxicologie Professionnelle et Environnementale, CHU de Grenoble ; Responsable de l'équipe « Environnement et prédiction de la santé des populations », Laboratoire TIMC, Université Grenoble Alpes – Compétences : médecine, toxicologie, IBE, métrologie des polluants, hygiène industrielle

Mme Florence PILLIERE – Conseiller médical en toxicologie à l'INRS – Compétences : médecine du travail, toxicologie, IBE

Mme Anne PLATEL – Maître de conférences à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille – Laboratoire de Toxicologie Génétique, Institut Pasteur de Lille - Compétences : Toxicologie, Génotoxicité, QSAR

M. Henri SCHROEDER – Enseignant chercheur à la Faculté des Sciences et Technologies de l'Université de Lorraine à Vandoeuvre-les-Nancy – Laboratoire CALBINOTOX, EA 7488 - Pharmacien neurobiologiste - Compétences : Neurotoxicité, polluants environne taux, comportement animal, développement cérébral, exposition périnatale

M. Olivier SORG – Chef de groupe de recherche à l'Université de Genève - Compétences : Docteur es science en biochimie, toxicologie expérimentale, dermatotoxicologie

M. Jérôme THIREAU – Chargé de recherche au CNRS - Compétences : Docteur es science, physiologie animale, biologie cellulaire, cardiotoxicité

M. Claude VIAU – Professeur associé à l'université de Montréal – Compétences : Toxicologie, IBE, hygiène industrielle, métrologie des polluants

M. Raymond VINCENT - Retraité (anciennement Chargé de mission à la Direction Déléguée aux Applications (INRS)) - Compétences : chimie, métrologie des polluants, évaluation des risques professionnels

RAPPORTEURS

M. Frédéric LIRUSSI – Maître de Conférences des Universités– Praticien Hospitalier (MCU-PH) à l'UFR des Sciences de Santé & CHU de Dijon - Compétences : Toxicologie Clinique, Toxicologie analytique, Immunité Innée, Reprotoxicité

Mme Valérie FESSARD – Chef d'unité du Laboratoire de fougères – Anses – toxicologue.

PARTICIPATION ANSES

Coordination et contribution scientifique

Mme Nathalie ARNICH – adjointe au responsable de l'unité évaluation des risques liés aux aliments.

Mme Camille BECHAUX – chargée de projet scientifique – unité méthodologie et études.

Mr Laurent BODIN– chef de projets scientifiques – unité d'évaluation des substances chimiques.

Mme Carole CATASTINI – chef de projets scientifiques – unité d'évaluation des risques liés à l'eau.

Mme Esther CHABOT– chargée de projets scientifiques – unité d'évaluation des risques liés à l'eau.

Mme Pascale PANETIER– responsable de l'unité d'évaluation des risques liés à l'eau.

Secrétariat administratif

Mme Séverine BOIX-PETRE – Anses

SOMMAIRE

Présentation des intervenants	3
Sigles et abréviations	9
Liste des tableaux	10
Liste des figures	10
1 Contexte, objet et modalités de traitement de la saisine.....	11
1.1 Contexte	11
1.2 Objet de la saisine	11
1.3 Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation	12
1.4 Prévention des risques de conflit d'intérêt.....	12
2 Informations générales.....	13
2.1 Cyanobactéries.....	13
2.2 Cyndrospermopsine : caractéristiques et propriétés physico-chimiques	14
3 Synthèse des données toxicologiques.....	16
3.1 Toxicocinétique	16
3.1.1 Absorption.....	16
3.1.2 Distribution.....	17
3.1.3 Métabolisme.....	17
3.1.4 Excrétion.....	18
3.2 Toxicité aiguë et subaiguë.....	19
3.2.1 Effets aigus et subaigus.....	19
3.2.1.1 Données chez l'Homme.....	19
3.2.1.2 Données chez l'animal.....	19
3.2.2 Irritation et sensibilisation	21
3.2.2.1 Données chez l'Homme.....	21
3.2.2.2 Données chez l'animal.....	21
3.3 Toxicité subchronique et chronique.....	21
3.3.1 Données chez l'Homme.....	21
3.3.2 Données chez l'animal.....	21
3.4 Effets sur la reproduction et le développement	24

3.4.1	Données chez l'Homme.....	24
3.4.2	Données chez l'animal.....	24
3.5	Génotoxicité.....	25
3.6	Cancérogénicité.....	36
3.7	Mécanismes d'action	36
4	Recueil des valeurs toxicologiques de référence	38
4.1	VTR aiguës par voie orale.....	38
4.2	VTR subchroniques par voie orale	38
4.3	VTR chroniques par voie orale.....	39
4.3.1	VTR à seuil	39
4.3.2	VTR sans seuil pour les effets cancérogènes	40
5	Proposition de VTR subchronique par voie orale	41
5.1	Choix de l'effet critique.....	41
5.2	Analyse des VTR existantes.....	41
5.3	Construction de VTR.....	42
5.3.1	Choix de l'étude clé	42
5.3.2	Choix de la dose critique	43
5.3.3	Ajustement allométrique	44
5.3.4	Choix des facteurs d'incertitude.....	45
5.3.5	Proposition de VTR subchronique par voie orale.....	45
5.3.6	Niveau de confiance	45
6	Conclusions du CES	47
7	Bibliographie	48
ANNEXES		54
Annexe 1 : Lettre de saisine.....		55
Annexe 2 : Recherche bibliographique sans restriction de date		57
Annexe 3 : Evaluation de la qualité des études de toxicité subchronique par voie orale de la cyndrospermopsine		58
Annexe 4 : Modélisation d'une BMD pour la cyndrospermopsine		63

Sigles et abréviations

ADME	Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion
ADN/ADNmt	Acide désoxyribonucléique / ADN mitochondrial
ALP	Phosphatase alcaline
ALAT	Alanine aminotransférase
Anses	Agence nationale de sécurité sanitaire alimentation environnement travail
ASAT	Aspartate aminotransférase
BMD	Benchmark Dose
BMDL	Limite inférieure de l'intervalle de confiance de la benchmark dose
BMR	Benchmark Response
BUN	Blood Urea Nitrogen (Urée dans le sang)
CBMN	Cytokinesis-block micronucleus
CES	Comité d'Experts Spécialisé
CYN	Cylindrospermopsine
CYP450	Cytochrome P450
DL50	Dose Létale 50
EDCH	Eau destinée à la consommation humaine
EFSA	European Food Safety Authority (Autorité européenne de sécurité des aliments)
ERS	Evaluation de Risques Sanitaires
GT	Groupe de Travail
HEC	Concentration équivalent humaine (= Human Equivalent Concentration)
ip	Intrapéritonéale
iv	Intraveineuse
LOAEL	Lowest Observed Adverse Effect Level (= Dose minimale entraînant un effet néfaste observé)
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level (= Dose maximale n'entraînant pas d'effet néfaste observé)
NTP	National Toxicology Program
OCDE	Organisation de coopération et de développement économiques
pc	Poids corporel
RfD	Reference Dose
SD	Standard Deviation

UF	Facteur d'incertitude (= Uncertainty Factor)
UF _A	Facteur d'incertitude inter-espèces
UF _D	Facteur d'incertitude au manque de données
UF _H	Facteur d'incertitude interindividuel
UF _L	Facteur d'incertitude lié à l'utilisation d'un LOAEL ou d'une BMD
US EPA	United States Environmental Protection Agency (États-Unis)
VTR	Valeur Toxicologique de Référence

Liste des tableaux

Tableau 1 : Identification de la substance et propriétés physico-chimiques (US EPA, 2015)	14
Tableau 2 : Etudes <i>in vitro</i> de la mutagénéicité et génotoxicité de la CYN	28
Tableau 3 : Etudes <i>in vivo</i> de la génotoxicité de la CYN	34
Tableau 4 : Synthèse de VTR subchroniques par voie orale.....	38
Tableau 5 : Synthèse de VTR chronique à seuil par voie orale	39
Tableau 6 : VTR subchronique par voie orale pour la CYN	47

Liste des figures

Figure 1 : Structure de la cyndrospermopsine.....	15
Figure 2 : Structure des variants naturels de la cyndrospermopsine connus à ce jour.....	15

1 Contexte, objet et modalités de traitement de la saisine

1.1 Contexte

Une valeur toxicologique de référence, ou VTR, est un indice toxicologique qui permet de qualifier ou de quantifier un risque pour la santé humaine. Elle établit le lien entre une exposition à une substance toxique et l'occurrence d'un effet sanitaire indésirable. Les VTR sont spécifiques d'une durée d'exposition (aiguë, subchronique ou chronique) et d'une voie d'exposition (orale ou respiratoire). La construction des VTR diffère en fonction des connaissances ou des hypothèses formulées sur les mécanismes d'action des substances. Actuellement, l'hypothèse par défaut est de considérer une relation monotone entre l'exposition, ou la dose, et l'effet, ou la réponse. En l'état actuel des connaissances et par défaut, on considère généralement que, pour les effets non cancérigènes, la toxicité ne s'exprime qu'au-delà d'un seuil de dose (Afsset, 2010).

En pratique, la construction de la VTR à seuil comprend les quatre étapes suivantes :

- choix de l'effet critique ;
- choix d'une étude de bonne qualité scientifique permettant généralement d'établir une relation dose – réponse ;
- choix ou construction d'une dose critique à partir des doses expérimentales et/ou des données épidémiologiques ;
- application de facteurs d'incertitude à la dose critique pour tenir compte des incertitudes.

L'élaboration des VTR suit une approche très structurée et exigeante qui implique des évaluations collectives par des groupes de spécialistes.

1.2 Objet de la saisine

Le Directeur général de la santé a saisi l'Anses le 19 juillet 2016 d'une demande d'actualisation de l'évaluation des risques liés à la présence de cyanobactéries et de leurs toxines dans les eaux destinées à la consommation humaine (EDCH), à la baignade et autres activités récréatives.

L'un des objectifs de ce travail est d'actualiser le corpus documentaire relatif à la toxicité des cyanobactéries et le cas échéant, sélectionner ou construire de nouvelles valeurs

toxicologiques de références représentatives de scénarios d'exposition liés à l'ingestion d'EDCH ou d'eau pendant les activités aquatiques récréatives telle que la baignade. Dans le cadre de cette saisine, une VTR subchronique par voie orale liée à l'ingestion de cyindrospermopsine est proposée.

1.3 Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation

L'Anses a confié au comité d'experts spécialisé (CES) « Eaux » l'instruction de cette saisine. Le CES « Valeurs sanitaires de référence » a été mandaté pour construire et valider la VTR pour la cyindrospermopsine lors d'une exposition répétée par voie orale.

Les travaux d'expertise ont été soumis régulièrement au CES tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques et tiennent compte des observations et éléments complémentaires transmis par les membres du CES. Les travaux ont été adoptés par le CES « Valeurs sanitaires de référence » réuni le 18 octobre 2018.

Ces travaux sont ainsi issus d'un collectif d'experts aux compétences complémentaires.

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) »

1.4 Prévention des risques de conflit d'intérêt

L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise.

Les déclarations d'intérêts des experts sont publiées sur le site internet du ministère en charge des solidarités et de la santé (<https://dpi.sante.gouv.fr>).

2 Informations générales

2.1 Cyanobactéries

Anciennement appelées « algues bleues » ou « algues bleu-vert », les cyanobactéries sont des micro-organismes procaryotes à Gram négatif dont la pigmentation peut varier du bleu-vert au rouge (De Reviers, 2002 et 2003). On les trouve aujourd'hui dans la plupart des écosystèmes.

Les cyanobactéries sont des procaryotes photosynthétiques, classées du point de vue systématique dans le règne des Eubactéries. À l'instar des autres bactéries, la structure cellulaire des cyanobactéries est caractérisée par l'absence de noyau et d'organites intracellulaires. Ces micro-organismes ont longtemps été rangés dans le règne végétal car ils présentent aussi des caractéristiques propres aux algues en vivant dans les eaux continentales et les milieux marins. Comme les végétaux, les cyanobactéries possèdent de la chlorophylle-a, et non de la bactériochlorophylle comme certaines bactéries. Elles renferment généralement, comme autres pigments photosynthétiques, des phycobiliprotéines et réalisent une photosynthèse productrice d'oxygène en utilisant l'eau comme donneur d'électrons.

La multiplication des cyanobactéries est végétative, c'est-à-dire asexuée, et s'effectue par division binaire d'une cellule mère en deux cellules filles, par bourgeonnement ou par divisions multiples. Selon les espèces et les conditions environnementales, les temps de doublement des populations varient de quelques heures à plusieurs jours.

Dans des conditions qui leur sont favorables, ces cyanobactéries connaissent des phases de prolifération massive aussi qualifiées d'efflorescences (bloom en anglais). Durant ces phases de prolifération massive, se développe une biomasse importante et une ou deux espèces deviennent alors très largement dominantes. Les effets indésirables pour l'environnement et la santé humaine sont alors nombreux.

La présence de cyanobactéries signalée sur tous les continents est source de préoccupation croissante vis-à-vis des risques sanitaires associés pour l'Homme et l'animal (Vichi *et al.* 2016). En effet, ces micro-organismes peuvent produire et libérer des cyanotoxines ou d'autres composés bio-actifs, capables d'agir sur différentes cibles telles que le foie et le système nerveux. L'Homme est exposé aux cyanotoxines principalement par ingestion d'EDCH ou accidentellement lors d'activités récréatives aquatiques.

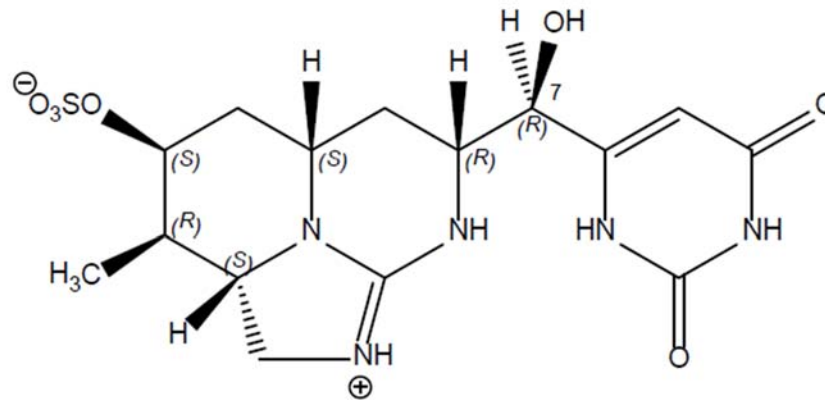
2.2 Cyindrospermopsine : caractéristiques et propriétés physico-chimiques

La cyindrospermopsine (CYN) est un alcaloïde de poids moléculaire 415.43 g.mole⁻¹ (Tableau 1) ayant une structure zwitterionique dont une sous-unité tricyclique et un groupement uracile (Figure 1). Elle est principalement produite par *Cyindrospermopsis raciborskii*, ainsi que d'autres variétés de cyanobactéries telles que *Aphanizomenon ovalisporum*, *Raphidiopsis curvata* et *Umezakia natans* (Banker *et al.*, 1997 ; Fristachi et Sinclair, 2008).

A ce jour, deux variants naturels de la CYN ont été identifiés : la 7-épicyindrospermopsine (7-épi-CYN) et 7-déoxycyindrospermopsine (7-déoxy-CYN) (de la Cruz *et al.*, 2013 ; Figures 1 et 2).

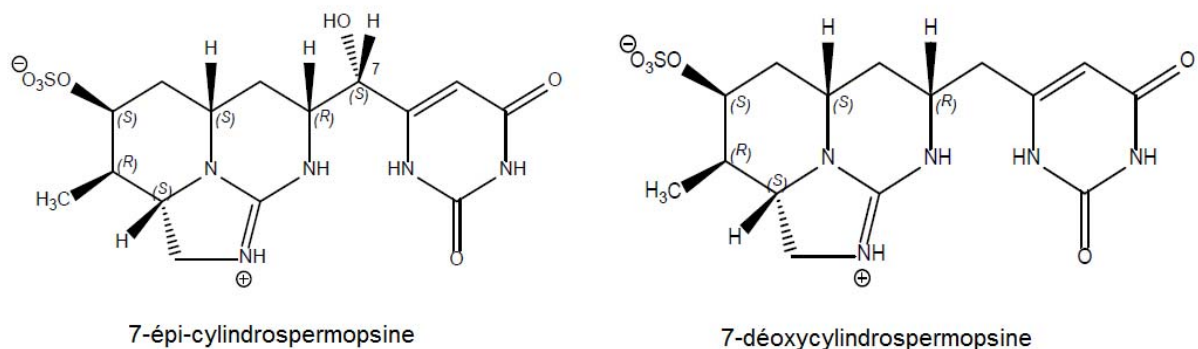
Tableau 1 : Identification de la substance et propriétés physico-chimiques (US EPA, 2015)

Nom	Cyindrospermopsine
CAS	143545-90-8
Abréviations	CYN - CYL
Formule	C ₁₅ H ₂₁ N ₅ O ₇ S
Forme physique	Poudre blanche
Poids moléculaire	415.43 g/mole
Densité	2.03 g/cm ³
Solubilité dans l'eau	Solubilité forte



Cylindrospermopsine

Figure 1 : Structure de la cylindrospermopsine



7-épi-cylindrospermopsine

7-déoxycylindrospermopsine

Figure 2 : Structure des variants naturels de la cylindrospermopsine connus à ce jour

Plus récemment, deux autres analogues ont été caractérisés, la 7-déoxydesulfo-CYN et 7-déoxydesulfo-12-acetyl-CYN (Wimmer *et al.*, 2014). On ne sait cependant pas s'il s'agit de variants, de précurseurs ou de produits de dégradation.

3 Synthèse des données toxicologiques

La synthèse des données toxicologiques a été rédigée sur la base des rapports de synthèse réalisés par des organismes reconnus au niveau international (US EPA, 2015 ; EFSA, 2016 ; Santé Canada, 2016) complétés par une recherche bibliographique réalisée sans restriction de date. Le détail de cette recherche bibliographique complémentaire est présenté en Annexe 2.

Les seules données qui ont été considérées pour proposer cette VTR sont les études par voie orale. Toutefois, certaines études par voie intrapéritonéale (ip), des études *in vitro* ont pu être décrites dans ce rapport par manque de données ou à des fins d'identification et de caractérisation du danger.

3.1 Toxicocinétique

Aucune étude *in vivo* par voie orale décrivant la toxicocinétique de la CYN n'a été identifiée à ce jour. Les seules données acquises permettant de décrire les paramètres d'absorption, distribution, métabolisme et excrétion (ADME) de la CYN proviennent d'études réalisées chez le rongeur par la voie ip et d'études menées *in vitro*.

3.1.1 Absorption

Aucune donnée *in vivo* n'a permis de caractériser l'absorption de la CYN après une exposition (orale ou ip). Néanmoins, les études où la toxine est administrée par voie orale montrant un effet systémique suggèrent une absorption par le tractus gastro-intestinal (Humpage et Falconer, 2002-2003 ; Sukenik *et al.*, 2006 ; Chernoff *et al.*, 2018).

Fernandez *et al.* (2014) ont montré le passage de la CYN au sein de la lignée cellulaire intestinale humaine Caco-2 en réalisant des tests de perméabilité. Si le passage de la molécule est temps et dose dépendant, il a néanmoins été montré que l'absorption de la molécule était limitée (2,4 – 2,7% de la concentration initiale après 3 heures d'exposition, 16,7 – 20,5 % après 24 heures).

Pichardo *et al.* (2017) ont également étudié les mécanismes d'absorption intestinale en exposant des cellules Caco-2 à la CYN. Les auteurs ont mis en évidence un passage de la molécule du pôle apical au pôle baso-latéral. Un transport paracellulaire a pu être mis en évidence au cours de l'étude.

3.1.2 Distribution

La distribution de la CYN a seulement été étudiée *in vivo* par voie ip en solution saline (CYN pure à plus de 95%) chez des souris mâles Quackenbush (Norris *et al.*, 2001).

Dans un premier temps, quatre souris ont été exposées à une dose unique sublétales de 0,1 mg.kg⁻¹ de ¹⁴C-CYN. Après 48 heures, une analyse de la toxine a été réalisée : 13,1% de la dose a été retrouvée dans le foie et moins de 1% dans les reins et la rate. On retrouve 68% de la dose dans les urines et 15,5% dans les fèces.

Une deuxième étude consistait à exposer 12 souris à une dose de 0,2 mg.kg⁻¹. Les auteurs ont mesuré la teneur en CYN radiomarquée dans les matières fécales de tous les animaux après 12 et 24h, puis dans le foie, les reins et la rate des souris euthanasiées (5 sur 12, après 5 ou 6 jours) présentant des signes cliniques de toxicité, et des souris survivantes (7 sur 12, à 7 jours). Après 5 à 7 jours, les auteurs ont pu retrouver dans les reins et la rate 2,1 ± 2,1 %, de 0,15 ± 0,14 % de la dose initiale administrée, respectivement, et moins de 0,1 % (sans écart-type) de la dose dans la rate.

Enfin, Norris *et al.* (2001) ont évalué la distribution de la CYN chez 4 souris exposées à 0,2 mg.kg⁻¹ de ¹⁴C-CYN. Après 6 heures, les concentrations en CYN radiomarquée ont été déterminées dans le foie, les reins, le cœur, les poumons, la rate, le sang et la bile. La toxine a été détectée dans tous les tissus, principalement dans le foie à 20,6 % de la dose initiale administrée et dans les reins à 4,3 %. Après une semaine, on retrouve dans le foie environ 2 % de la dose initiale.

Des études *in vitro* sur des hépatocytes primaires de rats (Chong *et al.*, 2002) et des cellules Vero (cellules épithéliales de rein extraites d'un singe vert africain) (Froscio *et al.*, 2009) ont permis de montrer que l'absorption par les reins de la CYN était lente, progressive et non énergie-dépendante.

3.1.3 Métabolisme

Le métabolisme de la CYN semble être médié par le système des cytochromes P450 (CYP450). De plus, les métabolites produits par ce système seraient responsables de la cytotoxicité observée lors d'une exposition à la CYN. En effet, Runnegar *et al.* (1995) et Shaw *et al.* (2000) ont montré que l'activation de la CYN était nécessaire pour induire ses effets toxiques.

Froscio *et al.* (2003) ont prétraité des hépatocytes avec des inhibiteurs du CYP450 et ont observé une diminution de la cytotoxicité induite par la CYN. Norris *et al.* (2002) ont également montré une protection contre la CYN lorsque des souris mâles Quackenbush sont prétraitées avec un inhibiteur du CYP450.

Lors d'une série d'études *in vivo* sur la distribution et le métabolisme de la ¹⁴C-CYN chez des souris Quackenbush (injection par voie ip de 0,1 ou 0,2 mg.kg⁻¹), une analyse par HPLC dans les urines a mis en évidence trois pics différents sur le chromatogramme, suggérant la

présence de métabolites dans l'échantillon (Norris *et al.*, 2001). Le plus grand pic semblait être la molécule administrée, et le plus petit pic n'était pas présent dans tous les échantillons. La détection de ^{14}C dans le précipité de protéines dans les urines et le foie suggère la présence d'un métabolite lié aux protéines.

Straser *et al.* (2013a) ont exposé des cellules HepG2 à la CYN ($0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 12 ou 24 heures) pour réaliser une analyse toxicogénomique de certains gènes, notamment impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques. La CYN a induit une augmentation de la régulation de la transcription des enzymes de phase I (CYP1A1, CYP1B1, ALDH1A2 et CES2¹) et de phase II (UGT1A6, UGT1A1, NAT1 et GSTM3²) suggérant leur implication dans l'étape de détoxification de la molécule.

3.1.4 Excrétion

Aucune donnée sur l'excrétion de la CYN lors d'une exposition orale n'est disponible à ce jour. Seule l'étude *in vivo* de Norris *et al.* (2001) par voie ip est aujourd'hui disponible.

Dans une première expérience, quatre souris ont été exposées à une dose unique sublétales de $0,1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de ^{14}C -CYN (pure à plus de 95 %). Les urines et les fèces ont été collectées toutes les 12 heures durant 48 heures. Après 12 heures, le taux d'excrétion de ^{14}C était de $62,8 \pm 25,3\%$ et de $15,5 \pm 26,9 \%$ de la dose administrée (moyenne cumulative) des urines et fèces, respectivement.

Dans une deuxième expérience, des souris ont reçu une dose unique de $0,2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de ^{14}C -CYN et les urines et fèces ont été collectées à 12 et 24 heures post-injection. Après 12 heures, le taux d'excrétion de ^{14}C dans les urines était de $66,0 \pm 27,1\%$ et de $5,7 \pm 5,6 \%$ de la dose administrée (moyenne cumulative) dans les fèces. Après 24 heures, il était de $68,4 \pm 26,7 \%$ et $8,5 \pm 8,1 \%$ dans les urines et dans les fèces, respectivement.

Dans la dernière expérience, les urines et fèces de quatre souris ont été collectées 6 heures après une injection de $0,2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de ^{14}C -CYN. L'excrétion dans les urines était de $48,2 \pm 29,3 \%$ de la dose initiale et $11,9 \pm 21,4 \%$ dans les matières fécales. Les auteurs relèvent qu'une des quatre souris a éliminé plus de 40 % de la dose dans les fèces.

¹ CYP1A1/CYP1B1 : Cytochrome P450 1A1 et 1B1 ; ALDH1A2 : Aldéhyde déshydrogénase 1A2 ; CES2 : Carboxylesterase 2.

² UGT1A6/UGT1A1 : UDP-glucuronosyltransférase 1A6 et 1A1 ; NAT1 : N-acétyltransférase 1 ; GSTM3 : Glutathione S-transférase mu 3

L'élimination de la CYN, après métabolisation, se fait donc principalement par le rein, mais il a été également montré qu'une partie de la toxine était éliminée par les fécès, en utilisant le système de transport des acides biliaires notamment (Chong *et al.*, 2002)

3.2 Toxicité aiguë et subaiguë

3.2.1 Effets aigus et subaigus

3.2.1.1 Données chez l'Homme

Aucune donnée chez l'Homme n'est disponible à ce jour.

3.2.1.2 Données chez l'animal

En 1999, Seawright *et al.* ont administré à des souris MF1 mâles 1 mL de suspension saline de cellules de *Cylindrospermopsis raciborskii* lyophilisées (souches PHAWT/M et PHAWT/1) par gavage contenant 0,2% de CYN. Les doses uniques administrées allaient de 4,4 à 8,3 mg éq CYN.kg pc⁻¹. Il n'y a pas de groupe témoin dans cette étude. Après 24 heures, une perte d'appétit, de poids et une dépression est observée chez les souris exposées. Des décès ont été observés entre 2 et 6 jours après dosage. Les auteurs ont relevé des changements pathologiques tels qu'une infiltration graisseuse hépatique, une nécrose coagulative périacinaire et des tubules rénaux, une atrophie du cortex thymique et des follicules lymphoïdes au niveau de la rate. Des hémorragies au niveau du cœur et de multiples ulcérations de la muqueuse gastrique au niveau de l'œsophage ont également été relevées par les auteurs.

En 2001, Falconer et Humpage montrent qu'une dose de 2500 mg.kg pc⁻¹ d'extrait salin de cellules de *C. raciborskii* (souche AWT 205) lyophilisées constitue la dose létale minimale chez des souris Swiss. La teneur en CYN était de 5,5 mg.g⁻¹ dans l'extrait. Les auteurs en ont déduit une dose en équivalent de la cyanotoxine de 13,8 mg.kg pc⁻¹.

Shaw *et al.* (2000,2001) ont réalisé une étude par gavage où des groupes de quatre souris Quackenbush ont reçu par gavage un extrait de cellules *Cylindrospermopsis raciborskii* (souche AWT 205) lyophilisées dans de l'eau. Les doses étaient de 0 à 8 mg.kg pc⁻¹ de CYN. Les souris ont été observées durant 7 jours. Les souris exposées ont montré une hépatomégalie, expliquée par une vacuolisation des lipides au niveau des hépatocytes, traduisant une stéatose hépatique. Les foies les plus endommagés ont montré de larges zones nécrotiques. Les auteurs notent également une nécrose des tubules dans le cortex rénal et rapportent un hématome rétro-orbital unilatéral chez une souris. Une mortalité est apparue chez deux souris sur quatre à 6 mg.kg pc⁻¹ (5 jours post-exposition) ainsi que chez toutes les souris à 8 mg.kg pc⁻¹ (24 à 48 heures après exposition).

Une autre étude à court terme (14 jours) a été réalisée par Shaw *et al.* (2000, 2001). Il s'agit d'une étude par gavage quotidien de souris Quackenbush ayant reçu la CYN purifiée à partir d'extraits de *C. raciborskii* lyophilisés. Les doses étaient comprises entre 0 et 0,3 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ et ont permis aux auteurs d'établir un NOAEL de 0,05 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ et un LOAEL de 0.15 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ en décrivant l'infiltration lipidique dans le foie comme effet critique. Une lymphophagocytose a aussi été observée à 0.3 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹ dans la rate.

Bazin *et al.* (2012) ont exposé par gavage des souris mâles Swiss albino à la CYN (pure à plus 98%) à des concentrations de 1, 2 et 4 mg.kg pc⁻¹. Une des souris traitées a montré un état moribond après 24 heures et un foie rouge foncé ainsi qu'un intestin hémorragique à l'analyse *post mortem*. Une autre souris a montré à la même dose des saignements intestinaux. Une souris est morte après une dose orale de 2 mg.kg⁻¹. Les analyses histologiques ont révélé une apoptose au niveau du foie et du rein des souris exposées à 2 et 4 mg.kg⁻¹. À ces mêmes doses, l'apoptose de lymphocytes dans les plaques de Payer du duodénum et du jéjunum a été mise en évidence.

Six souris Quackenbush et deux rats Wistar ont été exposés à de l'eau provenant d'un bassin endigué contenant 800 µg.L⁻¹ de CYN durant 3 semaines. Les auteurs estiment une dose journalière basée sur la consommation d'eau des animaux de 0.2 mg.kg pc⁻¹ (pour les deux espèces). À cette dose, aucun effet histologique et clinique n'est relevé chez les deux espèces. Aucune autre information n'est disponible et présentée dans cette publication (Shaw *et al.*, 2001).

En 2004, Reisner *et al.* ont mené une étude sur 3 semaines, exposant quotidiennement des souris ICR mâles de 4 semaines à la CYN purifiée à partir d'*A. ovalisporum*. Un groupe de 8 souris a été exposé à de l'eau *ad libitum* contenant 0,6 mg.L⁻¹ de CYN, soit une dose estimée à 66 µg.kg pc⁻¹.j⁻¹ (pour une consommation de 2,8 mL d'eau par jour) et un groupe témoin de 8 souris n'a reçu que de l'eau de boisson non traitée *ad libitum*. Les auteurs ont observé un gain de poids corporel significatif semblable pour les deux groupes. À l'autopsie, les poids du foie et des testicules étaient plus élevés pour les souris traitées que pour celles du groupe contrôle. Concernant le taux d'excrétion urinaire, il est augmenté de façon significative chez les souris exposées par rapport aux souris témoins tandis que la concentration en acide orotique urinaire est diminuée chez les animaux traités par rapport au groupe témoin. Une augmentation de l'hématocrite est observée après 21 jours d'exposition à la CYN de même que des changements morphologiques des hématies. L'exposition à 66 µg.kg pc⁻¹.j⁻¹ de CYN a aussi entraîné une augmentation du niveau de cholestérol dans les membranes des hématies et dans le plasma ainsi qu'une diminution du cholestérol dans le foie par rapport au groupe non exposé. Le LOAEL dans cette étude est établi à 66 µg.kg pc⁻¹.j⁻¹.

3.2.2 Irritation et sensibilisation

3.2.2.1 Données chez l'Homme

Aucune donnée chez l'Homme n'est disponible à ce jour.

3.2.2.2 Données chez l'animal

Stewart *et al.* (2006) ont réalisé un essai de gonflement des oreilles de souris (MEST) chez des souris femelles Balb/c pour évaluer les effets irritants et sensibilisants après exposition à la CYN purifiée ou à une suspension contenant de la CYN produite par *Cylindrospermopsis raciborskii*. La substance a été appliquée sur la peau de l'abdomen des animaux pendant la phase dite d'induction. Elle a été à nouveau appliquée 10 et 17 jours après la phase d'induction sur l'oreille de chaque animal. L'épaisseur des oreilles a été mesurée 24 et 48 heures après les deux dernières applications. Un gonflement de l'oreille de plus de 20 % sur une ou plusieurs souris était considéré comme une réponse positive. Des réactions d'hypersensibilité ont été relevées par les auteurs chez 2 souris sur 9 traitées à la cylindrospermopsine (contre aucun témoin) et chez 8 souris sur 10 (contre aucun témoin) chez les souris exposées à la suspension cellulaire. Des réactions irritantes ont également été relevées lors de la phase d'induction.

Si l'étude de Stewart *et al.* (2006) semble mettre en évidence des effets irritants et sensibilisants après exposition à la CYN, des études supplémentaires sont nécessaires pour confirmer les résultats observés dans cette unique étude.

3.3 Toxicité subchronique et chronique

3.3.1 Données chez l'Homme

Aucune donnée chez l'Homme n'est disponible à ce jour.

3.3.2 Données chez l'animal

Shaw *et al.* (2001) ont réalisé une étude sur 90 jours impliquant des souris Quackenbush exposées à un extrait acellulaire de cellules de *Cylindrospermopsis raciborskii* (souche AWT 205) lyophilisées *via* l'eau de boisson. L'analyse histologique du foie, des reins, de la rate, du cœur, des poumons et du thymus n'a montré aucun effet aux doses supérieures à 0,15 mg.kg pc⁻¹.j⁻¹.

Humpage et Falconer (2002-2003) ont exposé des souris mâles Swiss Albino (0, 216, 432, 657 et 687 µg.kg pc⁻¹.j⁻¹, pendant 10 semaines) à un extrait aqueux de cellules de *Cylindrospermopsis raciborskii* (AWT 205) dans de l'eau de boisson. Les auteurs relèvent une réduction de la consommation d'eau des animaux exposés. La consommation d'eau des souris du groupe contrôle a été limitée à 5 mL par jour en conséquence. Une diminution significative du poids corporel des souris exposées à 432 et 657 µg.kg pc⁻¹.j⁻¹ a été observée.

À l'autopsie, les animaux de tous les groupes présentaient une forte augmentation du poids relatif du foie et des reins. On peut également noter une augmentation significative de la bilirubine et de l'albumine dans le sérum à une dose de $216 \mu\text{g.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ et aux doses supérieures. Les auteurs proposent ainsi un LOAEL de $216 \mu\text{g.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ basé sur l'augmentation du poids du foie.

Humpage et Falconer (2002-2003) ont également réalisé une étude où des souris mâles Swiss Albino ont été exposées à la CYN purifiée à partir d'extrait de cellules de *Cylindrospermopsis raciborskii* (souche AWT 205) lyophilisées dans de l'eau. La pureté n'est pas précisée par les auteurs, qui rapportent cependant une contamination importante de leur échantillon probablement par de la phénylalanine. Aucune autre purification n'a été réalisée par manque de matériel. Les souris ont reçu une dose quotidienne par gavage de 0, 30, 60, 120 et $240 \mu\text{g.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ durant 11 semaines. Une diminution du poids corporel a été observée de façon significative par rapport au groupe témoin chez les souris exposées à 30 et $60 \mu\text{g.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ après 4 semaines de traitement, qui peut être dépendante de la consommation d'eau, qui est également significativement réduite chez tous les groupes exposés. Une augmentation significative du poids relatif des reins et du poids absolu des testicules est relevée à partir de $60 \mu\text{g.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ d'exposition de même que le poids relatif du foie à $240 \mu\text{g.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ d'exposition. Concernant les paramètres sériques, aucun changement n'est observé à part une augmentation du cholestérol plasmatique pour tous les groupes et ce de façon significative pour les groupes de souris exposées à 30 et $60 \mu\text{g.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$. Dans les urines, une diminution de la masse volumique est observée à $240 \mu\text{g.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ et une diminution du taux de protéines urinaires est notée pour les groupes 120 et $240 \mu\text{g.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$. Concernant les paramètres hématologiques, aucun changement significatif n'est relevé. Les coupes histologiques du foie ont montré des dommages mineurs aux doses 120 et $240 \mu\text{g.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$. Une des sections du rein du groupe exposé à $240 \mu\text{g.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ a montré des altérations histologiques au niveau du tubule proximal (similaires à ceux observés dans l'étude par eau de boisson). D'autres sections ont montré de petits amas de cellules dégénérescentes au niveau du tubule proximal accompagné d'une infiltration leucocytaire. Aucun signe histopathologique rénal n'est observé à des doses inférieures à $240 \mu\text{g.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$. Les auteurs établissent au vu des résultats un NOAEL de $30 \mu\text{g.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ en considérant l'augmentation du poids des reins comme effet critique.

Sukenik *et al.* (2006) ont mené des études sur 20 et 42 semaines en exposant des souris ICR mâles et femelles. Les groupes témoins ont eu à disposition *ad libitum* comme eau de boisson du milieu cyanobactérien BG11 (comprenant principalement 17 mM NaNO_3 , 0,23 mM K_2HPO_4 , 0,28 mM CaCl_2 , 0,075 mM MgSO_4 , 0,18 mM Na_2CO_3) sans CYN et les groupes exposés du milieu contenant une concentration variable de CYN provenant d'*Aphanizomenon ovalisporum*. La concentration de la toxine a été augmentée progressivement au cours de l'étude dans l'eau, allant de 100 à $550 \mu\text{g.L}^{-1}$. Les auteurs ont alors estimé une dose journalière de $10 \mu\text{g.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ durant les semaines 0 à 8, de

20 $\mu\text{g.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ durant les semaines 8 à 16, de 30 $\mu\text{g.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ pendant les semaines 16 à 24 et enfin de 55 $\mu\text{g.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ les semaines 24 à 42. Cette estimation est basée sur les mesures hebdomadaires de CYN réalisée par HPLC et sur la mesure quotidienne de consommation d'eau des souris grâce à des cages métaboliques. À la 20^{ème} semaine d'exposition, la moitié des souris de chaque groupe a été euthanasiée, tandis que l'autre moitié est exposée 22 semaines de plus avant euthanasie. Les animaux ont vu leur poids augmenter chez les mâles et femelles durant l'étude, mais aucune différence statistique n'a été notée par rapport aux témoins et entre chaque genre. Toutefois, l'autopsie à la fin de l'étude (42^{ème} semaine) a révélé une augmentation significative du poids relatif des foies des mâles et des femelles. Le poids relatif des reins, mâles et femelles, a augmenté de façon significative à la 20^{ème} semaine et à la 42^{ème} semaine par rapport aux souris du groupe contrôle. On a aussi noté une augmentation du poids relatif des testicules chez les mâles à 42 semaines. Par rapport aux groupes contrôles, les auteurs notent une augmentation de l'hématocrite pour les deux genres exposés aux semaines 16, 28 et 32 qui s'accompagne d'une déformation croissante des hématies au cours du temps. C'est ce dernier paramètre qui est considéré comme l'effet critique dans l'étude de 20 semaines et qui a permis aux auteurs d'établir un LOAEL de 20 $\mu\text{g.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$.

Chernoff *et al.* (2018) ont réalisé une étude de 90 jours où des souris mâles et femelles CD-1 (Swiss Webster) ont été exposés à la CYN (pure à plus de 95%) quotidiennement par gavage (0, 75, 150, 300 $\mu\text{g.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$). À l'issue de cette étude, les auteurs ont constaté des anomalies de pigmentation au niveau du foie des mâles exposés à 150 et 300 $\mu\text{g.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$. Une augmentation du poids du foie et des reins par rapport aux contrôles a été observée chez les deux genres à partir de 75 $\mu\text{g.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ chez les mâles et 150 $\mu\text{g.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ chez les femelles. Une augmentation du poids (relatif et absolu) des testicules à 300 $\mu\text{g.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$. Concernant les analyses biochimiques, les auteurs ont relevé une augmentation du taux des phosphatases alcalines (PAL), des ALAT, de la concentration en acide biliaire plasmatique, et de l'urée plasmatique avec des valeurs significatives pour l'urée plasmatique (75, 150, 300 $\mu\text{g.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$) et ALAT (300 $\mu\text{g.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$). Une diminution du taux de cholestérol plasmatique et une augmentation du nombre de triglycérides est également observée aux plus fortes doses d'exposition. Chez les femelles, seule une augmentation de l'activité d'ALP à 300 $\mu\text{g.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ est survenue. Au niveau des paramètres hématologiques, on relève une diminution de l'hématocrite et une augmentation des leucocytes, des monocytes et des lymphocytes chez les mâles. Chez les femelles, une augmentation des monocytes est observée à la plus forte dose d'exposition. Les auteurs ont également évalué les altérations histopathologiques hépatique et rénale à l'aide d'un système de score (0 pour aucune lésion, à 4 pour lésion sévère). Chez les mâles, on observe une désorganisation des tubules, une altération cytoplasmique (hypertrophie), une dégénérescence des hépatocytes, une inflammation variable et une accumulation de pigments. Les effets sont observés aux trois doses avec une sévérité variable. Chez les femelles, une désorganisation des tubules

rénaux est observée aux deux plus fortes doses. Un LOAEL est établi à $75 \mu\text{g.kg pc}^{-1}\text{.j}^{-1}$ basé sur l'augmentation du poids du foie.

Au vu des données disponibles, l'exposition (sub)chronique à la cylindrospermopsine par voie orale semble entraîner principalement des effets sur le foie et les reins.

3.4 Effets sur la reproduction et le développement

3.4.1 Données chez l'Homme

Aucune donnée chez l'Homme n'est disponible à ce jour.

3.4.2 Données chez l'animal

Almeida *et al.* (2013) ont réalisé une étude sur la toxicité fœtale et reproductive chez des rates Wistar femelles gestantes exposées à la CYN pure (Abraxis®) durant les jours 1 à 20 de gestation. Les doses étaient de 0, 0,03, 0,3 et $3 \mu\text{g.kg pc}^{-1}\text{.j}^{-1}$ de CYN et étaient administrées par gavage quotidien. Aucune différence significative n'est observée au niveau du poids. Les auteurs relèvent qu'il n'y a pas d'altération des paramètres de reproduction étudiés. Les squelettes fœtaux et organes collectés n'ont montré aucune malformation chez les fœtus après exposition durant l'organogenèse.

Les effets de la CYN (pure à plus de 98%) sur le développement ont été étudiés par Rogers *et al.* (2007) sur des souris gestantes CD-1 (Swiss-Webster) par voie intrapéritonéale. Dans la première expérience, les animaux étaient exposés à des concentrations allant de 8 à $125 \mu\text{g.kg}^{-1}$ aux jours 8 à 12 de gestation en vue d'évaluer les effets tératogènes de la CYN. Une forte mortalité est survenue chez les souris exposées aux doses supérieures à $32 \mu\text{g.kg}^{-1}$. Une forte augmentation du poids relatif du foie a été observée dans les groupes exposés à 8,16 et $32 \mu\text{g.kg}^{-1}$ et ce de façon dose-dépendante. Chez les fœtus, aucun effet significatif n'a été rapporté concernant le poids, la mortalité ou le développement squelettique.

Dans deux autres expériences, les souris gestantes ont été exposées à $50 \mu\text{g.kg}^{-1}$ aux jours de gestation 8 à 12 ou 13 à 17, en vue d'étudier les effets de l'exposition *in utero* sur le développement prénatal et postnatal (Rogers *et al.*, 2007). Une réduction de la taille des portées a été relevée. Une toxicité maternelle a été observée chez les deux groupes avec une incidence plus élevée pour les souris exposées aux jours 8 à 12 de gestation. En revanche, les souris exposées les jours de gestation 13 à 17 ont donné naissance aux petits significativement plus tôt que les contrôles. Les auteurs ont relevé un nombre significatif de petits morts et une toxicité (gastro-intestinale et hématologique) chez les survivants. Chez les petits dont les mères ont été exposées aux jours 8-12 de gestation, aucune différence significative n'est relevée concernant la viabilité et le gain de poids aux jours 5 et 6 postnatal tandis qu'une diminution de ces paramètres est observée pour les petits exposés *in utero*

aux jours de gestation 13 et 17. Après 15 mois, les mâles de ce dernier groupe avaient toujours un poids significativement plus petit que les contrôles.

Les mêmes auteurs ont réalisé une autre étude avec le même protocole (50 µg.kg⁻¹ aux jours 8 à 12 ou 13 à 17 de gestation) chez des souris CD-1 également (Chernoff *et al.*, 2011) pour évaluer la récupération des animaux après exposition à la CYN. Les mêmes effets toxiques chez les femelles gestantes ont été observés dans cette étude que chez les mères exposées dans l'étude de Rogers *et al.* (2007) (hémorragies et toxicité gastro-intestinale). Une augmentation des marqueurs de lésions hépatiques (ALAT, ASAT et SDH) et rénaux (urée et créatinine plasmatique) ont été relevés dans le sang, de même que des effets histopathologiques au sein du foie (nécrose centrilobulaire) et des reins (inflammation interstitielle). Une semaine après la dernière dose de CYN, les paramètres histologiques et sériques sont revenus similaires aux contrôles. La modification de l'expression de certains gènes observés 24 heures après la dose finale (impliqués dans la biogénèse des ribosomes, le métabolisme des lipides et xénobiotiques, la réponse inflammatoire et le stress oxydant) a persisté durant deux semaines et est revenue à la normale en quatre semaines.

Au vu de ces données, on ne peut statuer sur l'effet de la CYN sur le développement. Toutefois, Almeida *et al.* (2013) ont montré que l'exposition répétée à de faibles doses de CYN (moins de 3 µg.kg⁻¹.j⁻¹) n'avait pas d'effets sur le développement. La forte toxicité maternelle mise en évidence chez les souris gestantes exposées à la CYN (Rogers *et al.*, 2007 ; Chernoff *et al.*, 2011) peut être expliquée par le mode d'administration (voie intrapéritonéale). Des études par voie orale sont nécessaires pour évaluer les effets de la CYN sur la reproduction et le développement lors d'une exposition répétée.

3.5 Génotoxicité

Les données *in vitro* et *in vivo* sur la mutagénicité et la génotoxicité induites par la CYN sont recensées dans les tableaux 2 et 3.

Les études *in vitro* réalisées avec la CYN pure ou un extrait hautement purifié montrent que la toxine provoque la formation de micronoyaux (Humpage *et al.*, 2000 ; Bazin *et al.*, 2010 ; Straser *et al.*, 2011 ; Zegura *et al.*, 2011 ; Hercog *et al.*, 2017). Cette induction serait plutôt provoquée par un effet aneugène qu'un effet clastogène avec perte de chromosomes comme observé par Humpage *et al.* (2000) et comme semble l'indiquer le test des aberrations chromosomiques, pour lequel le nombre de métaphases exploitables est très faible (Lankoff *et al.*, 2007).

La majorité des tests des comètes sans Formamidopyrimidine DNA glycosylase (FPG) indique une augmentation des dommages de l'ADN en présence de CYN purifiée (Humpage *et al.*, 2005 ; Straser *et al.*, 2011 ; Zegura *et al.*, 2011 ; Hercog *et al.*, 2017) et une seule étude montre une augmentation des dommages oxydatifs en présence de FPG corrélés à

une augmentation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO ou ROS) intracellulaires (Straser *et al.*, 2013c).

Des études complémentaires (Bain *et al.*, 2007 ; Zegura *et al.*, 2011 ; Straser *et al.*, 2011) concluent également à des effets significatifs sur l'expression de gènes impliqués dans la réponse aux dommages à l'ADN.

Par conséquent la plupart des résultats suggèrent que la cylandrospermopsine possède des capacités génotoxiques *in vitro*. Si un effet aneugène a été clairement établi, des lésions de l'ADN ont également été observées avec le test des comètes. L'origine de ces lésions n'a néanmoins pas été établie.

Les résultats des tests réalisés *in vivo* restent très parcellaires (Tableau 3). Le seul test micronoyau sur la moelle osseuse exposant les animaux à de la toxine purifiée a été réalisé par voie intrapéritonéale, et les résultats sont négatifs. Néanmoins, les auteurs n'ont relevé aucune cytotoxicité, ce qui peut indiquer que la toxine n'a pas atteint le tissu ou en tout cas pas en concentration suffisante pour induire un effet (Bazin *et al.*, 2012). En revanche, le même test réalisé sur du sang circulant après exposition des animaux par voie ip d'extraits de cyanobactéries montre une réponse positive (Fonseca *et al.*, 2014). Après une exposition orale de CYN, le test du micronoyau sur colon se montre négatif également (Bazin *et al.*, 2012). Il faut noter toutefois que cette mesure a été effectuée 24 heures après une administration unique.

Concernant le test des comètes, deux études (Bazin *et al.*, 2012 ; Dordevic *et al.*, 2017) sont disponibles après une administration par voie ip de CYN de pureté identique à des doses équivalentes mais montrent des résultats contradictoires au niveau du foie : Dordevic *et al.* (2017) montrent une altération histopathologique du foie corrélée à une augmentation des enzymes sériques ASAT et ALAT ce qui suggère plutôt un effet lié à de la cytotoxicité et non à de la génotoxicité. Par ailleurs, une seule dose a été testée pour la CYN purifiée alors que trois doses ont été testées par Bazin *et al.* (2012) où les résultats se révèlent négatifs. Des résultats similaires sur le foie semblent être obtenus par Shen *et al.* (2002) avec un autre système de mesure. Pour les effets sur d'autres organes, seule l'étude de Bazin *et al.* (2012) est disponible. Elle souligne une réponse positive dans le colon après injection par voie ip de CYN et après gavage ainsi qu'une réponse positive dans la moelle osseuse seulement après gavage.

Il est donc difficile de conclure sur les données *in vivo* obtenues jusqu'ici. Des dommages de l'ADN au niveau du foie ont été observés mais principalement après administration par voie ip et probablement associés à un effet cytotoxique sur cet organe. Les altérations observées sur le colon après exposition à la CYN par gavage et injection intrapéritonéale devraient être confirmées dans des études complémentaires. Il est nécessaire que de nouvelles études soient effectuées *in vivo* en respectant plus fidèlement les lignes directrices pour les tests des comètes et du micronoyau, à savoir, trois doses testées, au moins trois administrations

consécutives pour le test des comètes et un temps de latence suffisant après l'exposition pour l'expression des micronoyaux.

Si les résultats *in vitro* suggèrent un effet génotoxique de la CYN, les résultats *in vivo* restent très parcellaires et une seule étude réalisée par gavage a montré des résultats positifs (fragmentation accrue de l'ADN) au niveau du colon sur six organes investigués. Par conséquent, des tests complémentaires sont nécessaires. Concernant le mode d'action, si un effet aneugène et/ou clastogène a été décrit, l'induction de lésions à l'ADN a également été observée sans que leur origine n'ait été clairement établie.

Tableau 2 : Etudes *in vitro* de la mutagénécité et génotoxicité de la CYN

Référence	Toxine	Modèle expérimental	Essai réalisé	Conditions d'exposition	Contrôles	Résultats principaux
Humpage et al., 2000	Extrait purifié (<i>C.raciborskii</i>)	Cellules humaines lymphoblastoïdes (WIL2-NS)	Test du micronoyau avec cytochalasine B Micronoyaux comptés dans les cellules binucléées.	1, 3, 6 et 10 µg.mL ⁻¹ 24 h	Négatif : oui Positif : MMC (0.1 µg.mL ⁻¹)	Augmentation concentration-dépendante significative de micronoyaux dans les cellules binucléées (6 et 10 µg.mL ⁻¹) Augmentation significative à toutes les doses de manière concentration-dépendante. Diminution de l'index mitotique Augmentation des cellules confirmée par le marquage CEN des MNs. Pas d'augmentation des cellules nécrotiques et apoptotiques
Fessard & Bernard 2003	Extrait purifié (<i>C.raciborskii</i> – AWQC CYP-026J) (Pureté non indiquée)	Cellules de hamster CHO-K1	Test des comètes en condition alcaline	0,5-1 µg.mL ⁻¹ 24 h	Négatif : oui Positif : Etoposide (0,5 µg.mL ⁻¹)	Aucune induction statistiquement significative de dommages ADN observée. Aucune mortalité aux deux concentrations à 24 h mais inhibition de la prolifération. Diminution des mitoses après 24h Effet absent ou léger sur l'apoptose à 24 et 48 h
Humpage et al., 2005	Extrait purifié (<i>C.raciborskii</i>) Pureté > 98%	Hépatocytes primaires de souris	Test des comètes version alcaline	0,05 – 5 µM 18 h	Négatif : oui Positif : Clofibrate (1 µM)	Augmentation des dommages à l'ADN pour toutes les concentrations et en particulier 0,05, 0,1 et 0,2 µM n'induisant pas ou peu de cytotoxicité. En présence d'un inhibiteur de CYP450, aucun dommage ADN n'est observé.
Bain et al., 2007	CYN isolée de cultures de <i>C.raciborskii</i>	Cellules humaines hépatiques HepG2 et C3A, fibroblastes	Expression de gènes impliqués dans la réponse aux dommages	1, 2,5 et 5 µg.ml ⁻¹ 6 et 24h	-	Pas d'augmentation de l'expression du gène <i>p53</i> dans les HDF mais dans Caco2 et HepG2. Augmentation de l'expression des gènes <i>GADD45a</i> ,

	AWT205 (Pureté non indiquée)	dermiques humains (HDF), cellules humaines intestinales Caco2	ADN par qPCR			<i>BAX</i> , <i>MDM2</i> dans HepG2 et HDF à 6h. Augmentation de l'expression du gène <i>CDKN1A</i> à 24h pour les HDF.
Lankoff et al., 2007	Extrait purifié (<i>C. raciborskii</i> – AWT205 et CYN Thai) (Pureté non indiquée)	Cellules de hamster CHO-K1	Test des aberrations chromosomiques avec et sans S9 (activation métabolique)	0,05 - 2 µg.mL ⁻¹ 3, 16 et 21h	Négatif : oui Positif : MMC 1 µg.mL ⁻¹ ou CP (20 µg.mL ⁻¹)	Aucune différence significative concernant le nombre d'aberrations chromosomiques quels que soient la concentration ou le temps d'exposition. La présence d'un activateur métabolique (S9) ne change pas les résultats. Diminution de l'index mitotique concentration et temps dépendante. A 1 et 2 µg.mL ⁻¹ , avec et sans S9, faible nombre de métaphases ne permettant pas la lecture après 16 et 21h de traitement. Augmentation de l'apoptose significative après 21h de traitement à 1 et 2 µg.mL ⁻¹ avec et sans S9. Augmentation du pourcentage de cellules nécrotiques après 21h de traitement à 1 et 2 µg.mL ⁻¹ et plus marquée en présence de S9 (mais problème de toxicité du S9 au-delà de 6h de traitement en général)
Bazin et al., 2010	CYN commerciale pure (pureté >98%)	Cellules humaines intestinales Caco-2 et hépatiques HepaRG, différenciées et indifférenciées	Test du micronoyau avec cytochalasine B Micronoyaux comptés dans les cellules binucléées.	0,5 – 2 µg.mL ⁻¹ 34h	Négatif : oui (milieu) Positif : MMS (15 et 30 µM) et AFB1 (1 et 5 µM) avec kétoconazole	Augmentation significative du nombre de micronoyaux dans les cellules binucléées chez les cellules Caco-2 différenciées et indifférenciées et chez les cellules HepaRG différenciées. En présence d'un inhibiteur de P450 (kétoconazole), l'induction de micronoyaux par la CYN est réduite mais pas d'effet sur les autres classes de cellules (apoptose, mitose, polynucléées). Pas d'augmentation des cellules apoptotiques et polynucléées mais diminution des cellules mitotiques avec cellules intestinales différenciées ou non

						Diminution des cellules polynucléées avec cellules HepaRG différenciées Pas d'effet sur les cellules en mitose et en apoptose pour HepaRG différenciées ou non
Maire et al., 2010	CYN commerciale pure (pureté >98%)	Cellules embryonnaires de hamster (SHE)	Test de transformation cellulaire	1x10 ⁻⁷ à 1 ng.mL ⁻¹ 7 jours	Négatif : oui Positif : oui	Réponse positive du pouvoir transformant entre 1x10 ⁻⁷ et 1x10 ⁻² ng.mL ⁻¹ et en absence de cytotoxicité.
Straser et al., 2011	CYN commerciale pure (Pureté non indiquée)	Cellules humaines hépatiques HepG2	Test des comètes version alcaline Test du micronoyau avec cytochalasine B Expression de gènes impliqués dans la réponse aux dommages ADN et dans le métabolisme par qPCR	0.005-0,5 µg.mL ⁻¹ 4, 12 ou 24h pour le test des comètes, 24h pour le test CBMN	Négatif : oui (milieu) Positif : BaP (30 µM pour le test de comètes et 10 µM pour le test du micronoyau)	Augmentation significative du pourcentage d'ADN dans la queue à 12 h (0,5 µg.mL ⁻¹) et à 24h (0,01-0,5 µg.mL ⁻¹). Pas d'effet à 4h de traitement ; effet cytotoxique à partir de 1 µg.mL ⁻¹ et 24h. Augmentation significative de micronoyaux (0,05-0,5 µg.mL ⁻¹), de ponts nucléoplasmiques micronoyaux (0,05-0,5 µg.mL ⁻¹) et de NBUDs (0,05 µg.mL ⁻¹) de façon concentration-dépendante. Diminution significative de l'index de division cellulaire à 0,5 µg.mL ⁻¹ . Augmentation significative de l'expression des gènes <i>CYP1A1</i> , <i>CYP1A2</i> , <i>CDKN1A</i> , <i>GADD45a</i> , <i>MDM2</i> à 0,5 µg.mL ⁻¹ et à 24h mais pas du gène p53.
Zegura et al., 2011	CYN commerciale pure (pureté non indiquée)	Cellules HPBLs (Human peripheral blood lymphocytes) Sang humain	Test des comètes version alcaline Test du micronoyau avec cytochalasine B Expression de gènes impliqués dans le métabolisme de CYN,	0-0,5 µg.mL ⁻¹ 4 et 24 h Sang complet pour le test des comètes et le test CBMN 0,5 µg.mL ⁻¹	Négatif : oui Positif : Bléomycine (0,04 µg.mL ⁻¹ , 2h)	Augmentation significative du pourcentage de l'ADN dans la queue à 0,5 µg.mL ⁻¹ après 4h et à 0,05-0,1 µg.mL ⁻¹ après 24h dans les HPBLs. Augmentation concentration et temps dépendante de micronoyaux et de NBUDs à 24h de traitement ; augmentation significative des micronoyaux seulement à 0,5 µg.mL ⁻¹ à 4h.

			dans la réponse aux dommages ADN, dans l'apoptose et le stress oxydant	4 et 24 h HPBLs isolés pour l'expression des gènes		Diminution de l'index de division seulement à 24h de traitement avec 0,1 et 0,5 µg.mL ⁻¹ . La CYN entraîne l'augmentation significative de l'expression de certains gènes après 24h : <i>CYP1A1</i> et <i>CYP1A2</i> , <i>P53</i> , <i>GADD45a</i> , <i>BAX</i> , <i>BCL-2</i> , <i>GPX</i> , <i>GSR</i> , <i>GGLC</i> , <i>SOD1</i> . Aucune différence observée pour les gènes <i>CDKN1A</i> et <i>CAT</i> .
Sierolawska et al. 2013	CYN commerciale pure et extraits provenant d'efflorescences cyano-bactériennes.	<i>Salmonella typhimurium</i> (souches TA98, TA 100, TA1535, TA 1537) et <i>E.coli</i> WP2 uvrA et WP2 (pKM101)	Test d'Ames avec et sans activation métabolique	CYN pure : 0,312-10 µg.mL ⁻¹		La CYN est retrouvée uniquement dans 2 extraits. L'extrait contenant uniquement de la CYN montre le plus fort potentiel de réversion, sur la TA98 avec S9 et sur la TA100 avec et sans S9. Aucun effet mutagène et pas d'inhibition de croissance avec la CYN pure sur les 6 souches et jusqu'à 10 µg.mL ⁻¹ (résultats obtenus non présentés). De même avec un mélange de 3 toxines pures (CYN, MC-LR et ATX-a).
Straser et al., 2013b	CYN commerciale pure (pureté non indiquée)	Cellules humaines hépatiques HepG2	Phosphorylation de l'histone H2Ax (détection cassures double brin de l'ADN) et analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux.	0-0,5 µg.mL ⁻¹ 24-96h	Négatif : oui (méthanol 0,05%) Positif : etoposide 1 µg.mL ⁻¹ , 24h et staurosporine	Formation de cassures double brin après 72h à 0,5 µg.mL ⁻¹ . Après 24h, un arrêt en G0/G1 est observé. Après 72 et 96h d'exposition, un arrêt en phase S est observé. Inhibition de la prolifération dès 0,5 µg.mL ⁻¹ à 24h.
Straser et al., 2013b	CYN commerciale pure (pureté non indiquée)	Cellules humaines hépatiques HepG2	Test des comètes avec et sans Fpg	0-0,5 µg.mL ⁻¹ 4, 12, 24h	Négatif : oui Positif : Tert-butyl hydroperoxide , (0.5 mM)	Pas de dommages ADN observés après 4h d'exposition à la CYN. Après 12 et 24h, la CYN induit une différence significative de cassure de brins ADN à une exposition de 0.25-0.5 µg.mL ⁻¹ avec et sans Fpg. Aucun dommage oxydatif ou apoptotique (caspases 3 et 7)

						n'est observé. CYN affecte le potentiel membranaire mitochondrial à partir de 0,25 µg.mL ⁻¹ à 12 et 24h de traitement
Fonseca et al., 2013	Eau traitée Extrait <i>C. raciborskii</i> (CYP-011K) Extrait contenant CYN Extrait non toxique	Cellules humaines hépatiques HepG2	Test des comètes version alcaline	0.1, 0.5, 1 µg.mL ⁻¹ 24, 48 et 72h	Négatif : non, comparaison avec l'eau traitée Positif : non	Des dommages ADN sont observés lors de l'exposition à l'extrait contenant la CYN uniquement à 0,5 µg.mL ⁻¹ après 48 et 72h et à 1 µg.mL ⁻¹ après 24, 48 et 72h d'exposition.
Blagus et al., 2014	CYN commerciale pure (pureté non indiquée)	Cellules humaines hépatiques HepG2 avec un plasmide qui code pour la protéine fluorescente DsRed2 sous le promoteur <i>CDKN1A</i> (Cellules HepG2CD-KN1A-DsRed)	Induction de la fluorescence DsRed déterminé par spectrofluométrie, microscopie à fluorescence et cytométrie en flux	24 et 48h d'exposition, concentrations non indiquées	4 composés génotoxiques sont testés pour évaluer la fiabilité de l'essai : MMS, CDDP, BaP et VLB.	Une LOEC (plus petite concentration induisant un effet) correspondant à plus de 1,5 fois la fluorescence relative de DsRed est établie à 0,12 µM de CYN. Avec une induction relative de fluorescence (RD) détectée à cette LOEC de 1,53 µM.
Hercog et al., 2017	CYN commerciale pure (pureté non indiquée) Comparé à la Microcystine-LR pure et un mélange des deux	Cellules humaines hépatiques HepG2	Test des comètes Micronoyau avec cytochalasine B Expression de gènes mesurée par qPCR	CYN : 0,01-0,5 µg.mL ⁻¹ 4 et 24h, en présence ou non de 1 µg.mL ⁻¹ de MC-LR	Contrôle négatif : Oui, solvant Contrôle positif : BaP 2,5 µM	Après 24h d'exposition, le pourcentage d'ADN dans la queue augmente à partir de 0,05 µg.mL ⁻¹ de CYN seule mais pas en présence du mélange CYN/MC-LR. Pas d'effet toxique avec 0.5 µg.mL ⁻¹ de CYN Le nombre de micronoyaux, de NPBs et de Nbuds augmente lors d'une exposition à 0.5 µg/mL de CYN en présence ou non de MC-LR. Une diminution de l'index mitotique est également observée à cette

	toxines.					<p>concentration.</p> <p>Augmentation non significative de l'expression des gènes du métabolisme <i>CYP1A1</i>, <i>CYP1A2</i> ainsi que l'expression des gènes impliqués dans la réponse aux stress (<i>FOS</i>, <i>JUN</i> et <i>TGFB2</i>) et dans les dommages ADN (<i>CDKN1A</i>, <i>GADD45A</i> et <i>ERCC4</i>)</p>
--	----------	--	--	--	--	--

Tableau 3 : Etudes *in vivo* de la génotoxicité de la CYN

Référence	Substance	Essai	Animal	Conditions d'exposition	Contrôles	Principaux résultats
Shaw et al. 2000	CYN purifiée	Marquage au ³² P et autoradiographie	Souris white Quackenbush mâles	1 µg.kg ⁻¹ .j ⁻¹ Injection unique par ip Euthanasie 24 à 96h post-injection	-	Dommages ADN observés dans le foie après 24h (adduits ADN)
Shen et al. 2002	Extrait purifié d'une culture de <i>C. Raciborskii</i> (pureté non indiquée)	Mobilité, densité et quantité moyenne de l'ADN dans le foie ; électrophorèse en condition alcaline	Souris Balb/c (2 mois ; 25-30g), 8 par groupe	0,2 mg.kg ⁻¹ Une seule injection en ip (0.9% NaCl) Euthanasie à 6,12,24,36,72h post-injection.	Contrôle négatif Pas de contrôle positif	Diminution de la MML (median molecular length) temps et dose-dépendante (sauf à 72h), traduisant l'augmentation des dommages des brins d'ADN lors de l'exposition à la CYN.
Bazin et al. 2012	CYN pure (pureté à plus de 98 %)	Test des comètes version alcaline sur 6 organes (sang, moelle osseuse, rein, foie, iléon, colon) (ip et gavage) et micronoyau moelle osseuse (ip seulement) et colon (gavage seulement)	Souris Swiss albino mâles (25g), 3 par groupe	ip : 50,100 et 200 µg.kg ⁻¹ Injection unique Gavage : 1,2 et 4 mg.kg ⁻¹ Administration unique Euthanasie à 24h post-administration	Contrôle négatif : oui (solution saline) Contrôle positif : MMS, 80 mg.kg ⁻¹ et DMH pour MN colon	Test des comètes : augmentation significative du pourcentage d'ADN dans la queue au niveau du côlon à 100 et 200 µg.kg ⁻¹ d'exposition à la CYN par IP et augmentation significative du au niveau du côlon à 4 mg.kg ⁻¹ et au niveau de la moëlle osseuse à 1 et 2 mg.kg ⁻¹ par gavage. Test des micronoyaux : aucun changement significatif observé chez les souris exposées à la CYN par voie ip dans la moelle osseuse et sans toxicité apparente ; de même par gavage au niveau du colon
Fonseca et al. 2014	Eau traitée Extrait <i>C. raciborskii</i> (CYP-011K)	Test du micronoyau dans le sang. Test des comètes	Souris Swiss albino Mâles (6 semaines ; 32,76 ± 2,65g) , 4 par	28 µg.kg ⁻¹ Une seule injection (ip).	Contrôle négatif (0.9% NaCl)	Dommages ADN significatifs observés chez les souris exposées à l'eau traitée+CYP-011K dans le sang et le foie.Augmentation des micronoyaux dans les érythrocytes des souris exposées à à

	Eau traitée contenant contenant l'extrait <i>C. raciborskii</i> (CYP-011K) Extrait non toxique (NPLP) Eau traitée contenant l'extrait NPLP.	version alcaline sur le sang et le foie.	groupe	Euthanasie à 48h post-injection.	Pas de contrôle positif	CYP-011K seul.
Dordevic et al. 2017	Extrait (au méthanol) de <i>C.raciborskii</i> contenant CYN (6,65 µg.mg ⁻¹ d'extrait) CYN pure commerciale (>98% pureté)	Test des comètes version alcaline sur les cellules du foie	Rats Albino Wistar mâles (2-2,5 mois ; 220-250 g) Une injection par voie ip unique Euthanasie après 24 ou 72h post-injection 5 par groupe et par temps	1500, 3000, 6000 et 12000 µg.kg ⁻¹ d'extrait soit 9,97, 19,95, 39,90 et 79.80 µg.kg ⁻¹ de CYN 79,80 µg.kg ⁻¹ de CYN pure	Contrôle négatif : solution saline Contrôle positif : EMS (300 mg.kg ⁻¹)	Augmentation significative du pourcentage d'ADN dans la queue, de la longueur et du tail moment à 24h et 72h dans le foie exposées aux extraits (quelle que soit la dose). La CYN pure entraîne une augmentation significative des paramètres également mais plus faiblement que la plus forte dose d'extrait (même dose équivalente de CYN, 79,80 µg.kg ⁻¹)

3.6 Cancérogénicité

Falconer et Humpage (2001) ont étudié l'activité initiatrice de tumeur de la CYN chez des souris mâles Swiss avec du 12-O-tétradécanoylphorbol 13-acétate (TPA), un agent promoteur. Les animaux ont été exposés par voie orale à des extraits de cellules de *Cylindrospermopsis raciborskii* (souche AWT 205) à des doses de 500 ou 1500 mg.kg⁻¹. Les auteurs estiment la dose équivalente en CYN à 2,75 mg.kg⁻¹ et 8,25 mg.kg⁻¹ pour les groupes exposés à 500 et 1500 mg.kg⁻¹ d'extraits, respectivement. Chaque groupe a reçu trois doses chacune séparées de deux semaines sans exposition. La majorité des souris (70 %) du groupe exposé à 1 500 mg.kg⁻¹ d'extraits sont mortes dans la semaine qui a suivi la deuxième dose. Deux semaines après l'administration de la dose finale, les animaux témoins et ceux exposés à la dose de 500 mg.kg⁻¹ d'extraits ont été divisés en sous-groupes nourris avec des aliments liquides contenant du TPA dissous dans du diméthylsulfoxyde (DMSO), ou des aliments contenant du DMSO seul, durant 24 heures (deux fois par semaine, pendant 30 semaines). Toutes les souris des groupes exposés à 1 500 mg.kg⁻¹ d'extraits ont elles aussi été exposées à des aliments liquides contenant du TPA. Des modifications néoplasiques ont été relevées chez cinq souris traitées avec de la CYN, mais chez aucune des souris témoins. Les changements néoplasiques ne comportaient aucune tendance particulière, car ils se sont produits chez des animaux, des organes cibles et des groupes de traitement différents; et les différences observées n'étaient pas statistiquement significatives. Ainsi, il est difficile de conclure sur la cancérogénicité de la CYN à l'issue de cette unique étude *in vivo*.

Maire *et al.* (2010) ont réalisé une étude *in vitro* pour évaluer le potentiel carcinogène de la cylindrospermopsine. Pour cela, ils ont utilisé des cellules embryonnaires de hamster de Syrie et ont effectué un essai de transformation cellulaire. Les cellules ont été exposées à de la CYN purifiée (à plus de 98 %) dissoute dans l'eau pendant 7 jours à des concentrations allant de 1.10⁻⁸ à 1.10⁻³ µg.mL⁻¹ dans une première expérience et de 1.10⁻¹⁰ à 1. 10⁻⁶ µg.mL⁻¹ au cours d'une deuxième. Les auteurs montrent une augmentation importante dans la transformation morphologique des cellules à des concentrations comprises entre 1.10⁻¹⁰ et 1.10⁻⁵ µg.mL⁻¹. Les concentrations de CYN supérieures à 1.10⁻⁵ µg.mL⁻¹ n'ont pas provoqué de transformation des cellules, et la CYN ne s'est pas montrée cytotoxique jusqu'à 0,01 µg.mL⁻¹.

À ce jour, il n'est pas possible de statuer sur le potentiel carcinogène de la CYN, au vu du nombre de données très limitées à ce sujet. De nouvelles recherches sont nécessaires pour caractériser ces effets.

3.7 Mécanismes d'action

Au vu des données sur la toxicité induite par la CYN disponibles à ce jour, le foie et les reins semblent être des organes cibles. Cependant, le mécanisme d'action de la toxine n'est pas encore bien décrit dans la littérature.

Máthé *et al.* (2016) ont réalisé une revue portant sur les mécanismes potentiels de toxicité de la CYN et les effets cellulaires qui en découlent. La CYN pourrait induire une toxicité aiguë médiée

par le système des CYP450 qui génère des métabolites (cf. § 3.1.3 ; Norris *et al.*, 2002 ; Froschio *et al.*, 2003), mais aussi une toxicité à long terme par des mécanismes tels que :

- L'inhibition de la synthèse protéique, qui a pu être mise en évidence lors d'une étude *in vivo* dans des cellules de foie de souris mâles ICR traitées à la CYN par voie ip (Terao *et al.*, 1994). L'inhibition du CYP450 n'a pas d'effet sur l'inhibition de la synthèse protéique lors d'une exposition à la CYN, tandis que la cytotoxicité a été diminuée (Froschio *et al.*, 2003). De nombreuses études depuis 1994 ont montré que la CYN inhibait directement la synthèse de protéines, *in vivo* comme *in vitro* (Runnegar *et al.*, 2002 ; Froschio *et al.*, 2001, 2003 ; López-Alonso *et al.*, 2013). La cible de la CYN pourrait ne pas être le ribosome même mais plutôt l'une des protéines solubles associées au système de traduction eucaryote (Froschio *et al.*, 2008).
- L'inhibition de la synthèse de glutathion (GSH) : l'exposition d'hépatocytes primaires de rats à la cylindrospermopsine a permis d'observer une diminution du taux de GSH dans les cellules. Cette diminution est la conséquence d'une inhibition de la synthèse de GSH et non d'une augmentation de son efflux ou sa consommation (Runnegar *et al.*, 1994, 1995 et 2002). Un prétraitement avec un inhibiteur du CYP450 (alpha-naphthoflavone) a permis une protection partielle contre la cytotoxicité et la diminution de la concentration de GSH cellulaire. Le rôle des métabolites issus de la biotransformation de la CYN par le CYP450 pourrait être plus important que le composé parent dans l'inhibition de la synthèse du GSH (Runnegar *et al.*, 1995).
- L'inhibition de la synthèse des pyrimidines : Reisner *et al.* (2004) ont montré lors d'une étude *in vitro* sur des extraits de cellules hépatiques de souris que la CYN est capable d'inhiber l'enzyme responsable de la conversion de l'orotate en uridine monophosphate (UMP), l'UMP synthétase. Après l'exposition de souris mâles ICR à 0,6 mg.L⁻¹ de cylindrospermopsine *via* l'eau de boisson pendant 21 jours, l'effet de la toxine sur l'activité de l'UMP synthétase était moins prononcé que lors de l'étude *in vitro*.

La toxicité de la CYN pourrait donc s'expliquer par de multiples mécanismes rendant difficile la description des effets cellulaires observés. Il est encore difficile de déterminer si les changements cellulaires observés lors d'une exposition à la toxine sont dus à la CYN elle-même ou à ses métabolites. Les mécanismes décrits ci-dessus sont probablement interconnectés et donc responsables des divers phénomènes observés au sein des cellules tels que la désorganisation du cytosquelette et de la chromatine, une perturbation du cycle cellulaire, un détachement des ribosomes du réticulum endoplasmique rugueux (granuleux), jusqu'à la mort cellulaire (Máthé *et al.*, 2016). Des études complémentaires sont nécessaires pour éclaircir le mode d'action de la CYN

4 Recueil des valeurs toxicologiques de référence

Les valeurs toxicologiques de référence existantes à ce jour pour la CYN sont rapportées dans les tableaux 4 et 5.

4.1 VTR aiguës par voie orale

Aucune VTR aiguë par voie orale n'a été construite à ce jour pour la cylindrospermopsine.

4.2 VTR subchroniques par voie orale

Humpage et Falconer (2002-2003) proposent à l'issue d'une étude une Tolerable Daily Intake (TDI) de $0,03 \mu\text{g.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$. L'étude en question implique des souris mâles Albino Swiss exposées par voie orale à la CYN purifiée (extraits de cellules de *Cylindrospermopsis raciborskii*) par gavage pendant 11 semaines. Un NOAEL de $30 \mu\text{g.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ basée sur l'augmentation du poids des reins est établie. Humpage et Falconer (2002-2003) appliquent à ce NOAEL un facteur de sécurité de 1000 (100 pour les variations intra et inter espèces, 10 pour le manque de données sur l'exposition subchronique, sur la tératogénicité et les effets, et pour le caractère soupçonné mutagène ou carcinogène de la CYN).

Une Reference Dose (RfD) de $0,1 \mu\text{g.kg pc}^{-1}.\text{j}^{-1}$ est calculée par l'US EPA (2015a) en utilisant comme étude source celle de Humpage et Falconer (2002-2003) décrite ci-dessus. L'US EPA applique un facteur de sécurité de 300 (100 pour les variations intra et inter espèces, et 3 pour le manque de données (données sur l'exposition chronique, sur la reproduction et le développement, sur la neurotoxicité et l'immunotoxicité)) (US EPA, 2015a et b).

Tableau 4 : Synthèse de VTR subchroniques par voie orale

Organisme /auteur(année)	Effet critique Etude source	Dose critique	UF	VTR
Humpage et Falconer (2002-2003)	Augmentation du poids des reins Humpage et Falconer (2002-2003) CYN purifiée (à partir d'extraits de cellules de <i>C.raciborskii</i>) administrée par gavage à des souris pendant 11	NOAEL = $30 \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$	1000 UF _A = 10 UF _H = 10 UF _D = 10	VTR = $0,03 \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$

	semaines			
US EPA (2015a)	Augmentation du poids des reins Humpage et Falconer (2002-2003) CYN purifiée (à partir d'extraits de cellules de <i>C.raciborskii</i>) administrée par gavage à des souris pendant 11 semaines	NOAEL = 30 µg.kg ⁻¹ .j ⁻¹	300 UF _A = 10 UF _H = 10 UF _D = 3	RfD = 0,1 µg.kg⁻¹.j⁻¹

4.3 VTR chroniques par voie orale

4.3.1 VTR à seuil

Une VTR chronique de 0,01 µg.kg pc⁻¹.j⁻¹ est calculée par l'Afssa-Afsset (2006) en utilisant comme étude source celle de Humpage et Falconer (2002-2003) décrite ci-dessus. Cette VTR a été construite à titre provisoire en l'attente de données plus robustes. Un facteur de sécurité de 3000 a été appliqué au NOAEL de 30 µg.kg pc⁻¹.j⁻¹ (100 pour les variations intra et inter espèces, 10 pour le passage d'une étude subchronique à un risque chronique et 3 pour tenir compte du fait que des effets génotoxiques sont suspectés) (Afssa-Afsset, 2006).

Tableau 5 : Synthèse de VTR chronique à seuil par voie orale

Organisme (année)	Effet critique Etude source	Dose critique	UF	VTR
Afssa-Afsset (2006)	Augmentation du poids des reins Humpage et Falconer (2002-2003) CYN purifiée (à partir d'extraits de cellules de <i>C.raciborskii</i>) administrée par gavage à des souris pendant 11 semaines	NOAEL = 30 µg.kg ⁻¹ .j ⁻¹	3000 UF _A = 10 UF _H = 10 UF _S = 10 UF _D = 3	VTR = 0,01 µg.kg⁻¹.j⁻¹

4.3.2 VTR sans seuil pour les effets cancérogènes

Aucune VTR sans seuil pour les effets cancérogènes par voie orale n'a été construite à ce jour pour la CYN.

5 Proposition de VTR subchronique par voie orale

5.1 Choix de l'effet critique

D'après les études disponibles, les effets les plus sensibles (apparaissant aux doses testées les plus faibles) lors d'une exposition subchronique par voie orale à la CYN chez le rongeur sont observés au niveau du foie et des reins. Une augmentation du poids (absolu et/ou relatif) de ces deux organes a été observée à plusieurs reprises (Humpage et Falconer 2002-2003 ; Sukenik *et al.*, 2006 ; Chernoff *et al.*, 2018) et a pu être corrélée à une augmentation de certains paramètres biochimiques et des modifications histologiques. Pour le foie, une augmentation des transaminases ASAT, ALAT et PAL a été rapportée ainsi que des altérations histologiques (anomalies de pigmentation, altérations et hypertrophie des hépatocytes, inflammation, lyse des hépatocytes). Au niveau des reins surviennent des altérations morphologiques et histologiques au niveau des tubules et de la zone médullaire. L'augmentation du poids de ces organes n'est donc pas d'origine adaptative mais bien dégénérative.

Ainsi, le CES considère comme effet critique l'augmentation du poids du foie et des reins corrélés à des atteintes histologiques et biochimiques.

5.2 Analyse des VTR existantes

Il existe deux VTR subchroniques à ce jour, utilisant comme étude clé celle de Humpage et Falconer (2002-2003) où les souris sont exposées par gavage. Cependant, cette étude montre plusieurs points amenant à remettre en cause son statut d'étude source, à savoir :

- La dose de la toxine administrée : La CYN utilisée dans l'étude a été produite à partir de cellules de *Cylindrospermopsis raciborskii*. Les auteurs ont purifié la toxine par HPLC à partir de 20 L de culture de cellules. Aucun dosage de la toxine après purification n'a été mentionné dans la publication. Il semblerait que seule une caractérisation qualitative ait été faite pour déterminer la pureté des fractions collectées. Les auteurs rapportent d'ailleurs à ce propos la présence d'une impureté en quantité importante qui n'a pas été éliminée. Il existe donc une incertitude non négligeable sur la dose administrée à chaque souris, et sur l'agent causal des effets observés, en raison de la présence d'une impureté.
- Le caractère néfaste de l'effet retenu : Le choix du NOAEL est basé sur l'augmentation du poids des reins observée à partir de 60 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$. Cependant, cette néphromégalie n'est pas clairement associée à des modifications histopathologiques et/ou biologiques à cette dose. Dans cette étude, il n'est possible de relier cette augmentation du poids du rein à une véritable altération pathologique qu'à partir de la dose la plus élevée de l'étude.
- La durée de l'exposition : les auteurs n'ont pu réaliser une étude sur 90 jours comme préconisé dans la ligne directrice de l'OCDE pour un essai de toxicité subchronique par voie orale (OCDE 408, 2018), par manque de matériel.

Cette étude ne permet donc pas de proposer une VTR subchronique et amène à exclure également la VTR chronique existante (Afssa-Afsset, 2006) en raison du facteur de sécurité très élevé (3000) dû à l'extrapolation d'une étude subchronique à chronique et du manque de données sur le caractère génotoxique de la CYN.

Ainsi, compte tenu de ces limites mises en évidence, le CES ne retient pas les valeurs existantes et propose de construire une nouvelle VTR subchronique par voie orale basée sur une étude de meilleure qualité.

5.3 Construction de VTR

5.3.1 Choix de l'étude clé

L'étude utilisée pour construire les VTR existantes (Humpage et Falconer, 2002-2003) a été écartée du choix de l'étude clé pour les raisons mentionnées précédemment (cf. § 5.2).

L'actualisation de la littérature scientifique a permis d'identifier de nouvelles études évaluant l'effet de la CYN lors d'une exposition répétée par voie orale (Sukenik *et al.*, 2006 ; Chernoff *et al.*, 2018).

Dans l'étude de Sukenik *et al.* (2006), des souris ICR mâles et femelles sont exposées à la CYN *via* l'eau de boisson pendant 20 ou 42 semaines. Les auteurs ont étudié l'effet de la toxine en suivant un protocole d'escalade de dose (Step-up dose), consistant à augmenter par palier à quatre reprises la teneur en CYN (de 10 à 55 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$). Les principales altérations rapportées dans l'étude sont une hépatomégalie (42 semaines) et une néphromégalie modérée (20 et 42 semaines) ainsi que des altérations hématologiques. Seulement plusieurs points problématiques sont rencontrés :

- La préparation de la toxine : Les auteurs n'ont pas purifié la toxine utilisée et ont seulement dilué un milieu de culture de cellules d'*A. ovalisporum* dans l'eau de boisson. De plus, une teneur en 7-epiCYN a été relevée par les auteurs. Ainsi, il existe une incertitude quant à la part attribuable à la CYN dans les effets observés.
- Le protocole d'administration de la dose : Les auteurs utilisent un protocole « Step-up dose ». Or, ce type de protocole, utilisé plutôt pour des études aiguës ou subaiguës n'est pas adapté pour une étude subchronique dans la mesure où les animaux sont exposés à des doses différentes tout au long des 20 ou 42 semaines.
- La nature de l'effet critique : Dans cette étude, l'effet critique retenu par les auteurs est l'augmentation de l'hématocrite. Or, la consommation d'eau des souris dans cette étude n'est pas précisée alors que selon Humpage et Falconer, la cylindrospermopsine peut modifier la palatabilité de l'eau (Humpage et Falconer, 2002-2003). De plus, le poids des animaux reste tout au long de l'étude, en dessous du poids attendu d'après les données du fournisseur pour cette souche. Il est donc difficile de considérer la modification de l'hématocrite comme un effet critique indépendant de la consommation d'eau.

L'étude de Sukenik *et al.* (2006) ne fournit donc pas de données plus robustes que l'étude de Humpage et Falconer (2002-2003). Ainsi, elle n'est pas retenue pour établir une nouvelle VTR subchronique par voie orale.

Chernoff *et al.* (2018) ont réalisé une étude permettant d'évaluer les effets subchroniques par voie orale de la CYN. Les principales altérations rapportées sont les mêmes que celles de l'étude de Humpage et Falconer (hépatiques et rénaux) mais des paramètres supplémentaires viennent renforcer le caractère critique des effets observés. Le CES a décidé de retenir comme étude clé cette étude pour les raisons suivantes :

- La qualité de l'étude, classée 1 selon la classification de Klimisch (contre 2 pour l'étude de Humpage et Falconer (2002-2003) et 3 pour l'étude de Sukenik *et al.* (2006)) (Annexe 3) ;
- Le protocole suit la ligne directrice de l'OCDE pour un essai de toxicité subchronique par voie orale (OCDE 408, 2018). L'étude dure 90 jours, chaque groupe comporte 10 animaux de chaque genre par groupe et par dose. Il y a trois doses testées (75, 150 et 300 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$) et un groupe témoin.
- L'hépatomégalie observée dès la plus faible dose est associée à des anomalies histologiques (anomalie de pigmentation, hypertrophie, inflammation, lyse des hépatocytes, etc.) et biologiques (augmentation des ALAT à 300 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$). La néphromégalie (observée à 75 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ chez les mâles et 150 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ chez les femelles) est aussi associée à des anomalies histologiques (altérations variables des tubules rénaux). Aucune atteinte fonctionnelle rénale n'a cependant été identifiée.
- L'existence d'une relation dose-réponse entre l'intensité de l'atteinte hépatique et l'exposition à la CYN, même si une altération est observée dès la plus faible dose.

Cette étude lève les interrogations présentes dans l'étude de Humpage et Falconer (2002-2003), à savoir la dose ou l'effet critique est observée, le caractère critique des effets observés et la durée de l'exposition. Les effets hépatiques et rénaux ne peuvent plus être considérés comme la conséquence d'un simple processus d'adaptation physiologique mais bien comme un effet critique.

Ainsi, le CES décide de retenir l'étude de Chernoff *et al.*, (2018) comme étude clé pour construire une nouvelle VTR subchronique par voie orale basée sur l'augmentation du poids du foie et des reins.

5.3.2 Choix de la dose critique

Les préconisations de méthodologie suggèrent de privilégier la construction d'une Benchmark Dose (BMD) chaque fois que les données disponibles le permettent, de retenir un NOAEL en second choix et un LOAEL en dernière option (Anses, 2017).

L'étude de Chernoff *et al.* (2018) permet d'identifier une relation dose-réponse entre l'augmentation du poids relatif du foie chez les mâles et l'exposition à la CYN.

Cette relation dose-réponse a été modélisée à l'aide du logiciel Proast (Proast software version 65,7) proposé par l'EFSA (EFSA 2017) et élaboré par le RIVM pour construire une Benchmark

Dose (BMD). L'objectif de la démarche est d'estimer la dose correspondant à un pourcentage défini de réponse supplémentaire par rapport au témoin, appelé BMR pour Benchmark Response. S'agissant de variables continues (mesure d'une variable biologique), l'une des principales difficultés lors de la construction d'une BMDL concerne le choix de la BMR (Benchmark Response level), c'est-à-dire le choix de la modification maximale tolérée comme étant physiologique (ou non néfaste) pour le paramètre étudié. Pour les données continues, il est généralement préconisé d'appliquer un BMR de 5 ou 10%.

La modélisation a été réalisée pour ces deux pourcentage (Annexe 4). Il n'a pas été cependant possible de retenir les valeurs obtenues pour l'un ou pour l'autre pourcentage car d'après les recommandations du logiciel BMDS Wizard développé par ICF International (ICF BMDS WIZARD) les valeurs de BMDL obtenues se trouvent dans la zone d'extrapolation linéaire du modèle, rendant les résultats peu fiables. Cette zone d'extrapolation est liée au manque d'information relatif au choix du modèle expérimental dans lequel les trois doses d'expositions sont très éloignées de la dose témoin.

D'après le protocole expérimental de l'étude de Chernoff *et al.* (2018), les gammes de doses testées ne permettent pas de définir un NOAEL.

La dose critique retenue est donc la plus faible dose testée qui permet d'établir un LOAEL basé sur l'augmentation du poids des organes (foie et reins).

$$\text{LOAEL} = 75 \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$$

5.3.3 Ajustement allométrique

Pour réduire la valeur de l'incertitude sur la variabilité inter-espèce, un ajustement allométrique a été réalisé. Une dose équivalente humaine (HED = Human Equivalent Dose) est calculée à l'aide de l'équation suivante³ :

$$\text{Dose équivalente Homme} = \text{Dose animal} \times \left(\frac{\text{Poids animal}}{\text{Poids homme}} \right)^{1/4}$$

En l'absence de données moyennes concernant le poids de départ des souris de l'étude, un poids moyen de 25 g a été utilisé, comme préconisé par l'US EPA (US EPA, 2006). Celui utilisé pour l'Homme pour le calcul est de 70 kg.

Soit une dose critique :

³ Cette équation est issue des recommandations de l'US EPA (US EPA, 2006).

$$\text{LOAEL}_{\text{HED}} = 10,31 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$$

5.3.4 Choix des facteurs d'incertitude

Le calcul de la VTR à partir de l'étude de Chernoff *et al.* (2018) a été effectué à l'aide des facteurs d'incertitude suivants (Anses, 2017) :

- Variabilité inter-espèces (UF_A) : 2,5

L'ajustement dosimétrique réalisé a permis de calculer une dose équivalente humaine, à l'aide de l'équation précédente. Pour tenir compte de la variabilité toxicodynamique et d'incertitudes résiduelles, un facteur d'incertitude supplémentaire a été fixé à 2,5 selon les recommandations de l'IPCS (IPCS, 2005) et sur la base des pratiques de l'Anses.

- Variabilité interindividuelle (UF_H) : 10

Aucune donnée scientifique permettant de réduire la valeur par défaut n'étant disponible, la valeur de 10 est utilisée.

- Usage d'un LOAEL (UF_L) : 3

L'ECHA recommande d'utiliser un facteur UF_L de 3 lorsque le LOAEL de l'étude représente la plus faible dose à laquelle l'effet est observé (ECHA, 2012)

- UF_D : 1

Bien que le corpus des données soit quantitativement faible, les études disponibles sont cohérentes et l'effet critique est reproductible.

Un facteur d'incertitude global de 75 est donc utilisé pour la construction de la VTR.

5.3.5 Proposition de VTR subchronique par voie orale

$$\text{VTR} = \text{LOAEL}_{\text{HED}} / \text{UF} = 0,14 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$$

5.3.6 Niveau de confiance

Le niveau de confiance global a été attribué à cette VTR en se basant sur les critères suivants :

- Niveau de confiance dans la nature et la qualité du corpus de données : **Faible**

L'analyse bibliographique a révélé qu'il existait encore peu de données sur la cylindrospermopsine administrée par voie orale de façon répétée.

- Niveau de confiance dans le choix de l'effet critique et le mode d'action : **Fort**

L'effet critique observé est bien décrit par les auteurs et corrélé à plusieurs paramètres (histologiques, biochimiques). Il a également été observé dans d'autres études.

- Niveau de confiance dans le choix de l'étude clé : **Fort**

Il s'agit d'une étude subchronique par voie orale chez le rongeur qui suit les lignes directrices de l'OCDE (OCDE 408, 2018).

- Niveau de confiance dans le choix de la dose critique : **Faible-moyen**

La BMD modélisée à partir d'une relation dose-réponse observée n'a pas pu être retenue. L'étude permet de définir un LOAEL uniquement.

Le niveau de confiance global attribué par le CES pour cette VTR est donc **moyen**. **Ce niveau de confiance pourra être réévalué sous réserve de nouvelles études alimentant le corpus de données relatif à la toxicité de la cylindrospermopsine.**

6 Conclusions du CES

Une VTR subchronique par voie orale est proposée pour la CYN basée sur l'augmentation du poids des organes (reins et foie) (Tableau 6). Un niveau de confiance moyen été attribué à cette VTR.

Tableau 6 : VTR subchronique par voie orale pour la CYN

Effet critique (étude clé)	Concentration critique	UF	VTR
Augmentation du poids du foie et des reins corrélé à des atteintes histologiques et biochimiques. Chernoff <i>et al.</i> (2018)	LOAEL = 75 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ <u>Ajustement allométrique</u> LOAEL _{HED} = 10,31 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$	75 UF _A = 2,5 UF _H = 10 UF _L = 3	0,14 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$
			Niveau de confiance Moyen

Cette VTR subchronique par voie orale qui est proposée est associée à un indice de confiance moyen. Il s'agit d'une VTR transitoire susceptible d'être réévaluée si de nouvelles études subchroniques par voie orale sont amenées à être publiées et à alimenter les connaissances sur la toxicité relative à l'ingestion de cylindrospermopsine.

Date de validation du rapport d'expertise collective par le comité d'experts spécialisé : le 18/10/2018.

Signature :

Maisons-Alfort, le _____,

Au nom des experts du CES

« Caractérisation des dangers des substances et valeurs toxicologiques de référence »,

M Michiels

Président du CES

7 Bibliographie

Date de fin de la bibliographie : 31/06/2018

Afssa-Afsset. 2006. "Evaluation des risques liés à la présence de cyanobactéries et leur toxines dans les eaux destinées à l'alimentation, à la baignade et autres activités récréatives." : 227pp, juillet 2006.

Almeida, C. S. D., A. C. Costa de Arruda, E. Caldas de Queiroz, H. T. Matias de Lima Costa, P. F. Barbosa, T. M. Araújo Moura Lemos, C. N. Oliveira, E. Pinto, A. Schwarz, et P. Kujbida. 2013. "Oral exposure to cylindrospermopsin in pregnant rats: Reproduction and foetal toxicity studies." *Toxicol* 74:127-129. doi: 10.1016/j.toxicol.2013.08.051.

Anses (Agence Nationale de sécurité sanitaire de l'environnement de l'alimentation et du travail). 2017. "Valeurs Toxicologiques de références (VTR) : Guide d'élaboration de VTR de l'Anses." : Anses. 181 p.

Bain, P., G. Shaw, et B. Patel. 2007. "Induction of p53-regulated gene expression in human cell lines exposed to the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin." *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues* 70 (19):1687-1693. doi: 10.1080/15287390701434877.

Banker, R., Carmeli S., Hadas O., Teltsch B., Porat R., et Sukenik A. 1997. Identification of Cylindrospermopsin in *Aphanizomenon Ovalisporum* (Cyanophyceae) isolated from lake Kinneret, Israel." *Journal of Phycology* 33 (4):613-616. doi: doi:10.1111/j.0022-3646.1997.00613.x.

Bazin, E., S. Huet, G. Jarry, L. L. Hégarat, J. S. Munday, A. R. Humpage, et V. Fessard. 2012. "Cytotoxic and genotoxic effects of cylindrospermopsin in mice treated by gavage or intraperitoneal injection." *Environmental Toxicology* 27 (5):277-284. doi: 10.1002/tox.20640.

Bazin, E., A. Mourot, A. R. Humpage, et V. Fessard. 2010. "Genotoxicity of a freshwater cyanotoxin, cylindrospermopsin, in two human cell lines: Caco-2 and HepaRG." *Environmental and Molecular Mutagenesis* 51 (3):251-259. doi: 10.1002/em.20539.

Blagus, T., V. Zager, M. Cemazar, G. Sersa, U. Kamensek, B. Zegura, J. Nunic, et M. Filipic. 2014. "A cell-based biosensor system HepG2CDKN1A-DsRed for rapid and simple detection of genotoxic agents." *Biosens Bioelectron* 61:102-111. doi: 10.1016/j.bios.2014.05.002.

Chernoff, N., D. J. Hill, I. Chorus, D. L. Diggs, H. Huang, D. King, J. R. Lang, T. T. Le, J. E. Schmid, G. S. Travlos, E. M. Whitley, R. E. Wilson, et C. R. Wood. 2018. "Cylindrospermopsin toxicity in mice following a 90-d oral exposure." *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A* 81 (13):549-566. doi: 10.1080/15287394.2018.1460787.

Chernoff, N., E. H. Rogers, R. D. Zehr, M. I. Gage, D. E. Malarkey, C. A. Bradfield, Y. Liu, J. E. Schmid, R. H. Jaskot, J. H. Richards, C. R. Wood, et M. B. Rosen. 2011. "Toxicity and recovery in

the pregnant mouse after gestational exposure to the cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin." *Journal of Applied Toxicology* 31 (3):242-254. doi: 10.1002/jat.1586.

Chong, M. W. K., B. S. F. Wong, P. K. S. Lam, G. R. Shaw, et A. A. Seawright. 2002. "Toxicity and uptake mechanism of cylindrospermopsin and lophyrotomin in primary rat hepatocytes." *Toxicol* 40 (2):205-211. doi: 10.1016/S0041-0101(01)00228-8.

De La Cruz, A. A., A. Hiskia, T. Kaloudis, N. Chernoff, D. Hill, M. G. Antoniou, X. He, K. Loftin, K. O'Shea, C. Zhao, M. Pelaez, C. Han, T. J. Lynch, et D. D. Dionysiou. 2013. "A review on cylindrospermopsin: The global occurrence, detection, toxicity and degradation of a potent cyanotoxin." *Environmental Sciences: Processes and Impacts* 15 (11):1979-2003. doi: 10.1039/c3em00353a.

De Reviere, B., 2002. Biologie et phylogénie des algues : t.1, Belin Sup Sciences : biologie. Belin, Paris. 352 p.

De Reviere, B. 2003. Biologie et phylogénie des algues : t.2, Belin Sup Sciences : biologie. Belin, Paris. 255p.

Đorđević, N. B., S. L. Matić, S. B. Simić, S. M. Stanić, V. B. Mihailović, N. M. Stanković, V. D. Stanković, et A. R. Ćirić. 2017. "Impact of the toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju on laboratory rats in vivo." *Environmental Science and Pollution Research* 24 (16):14259-14272. doi: 10.1007/s11356-017-8940-6.

ECHA (European Chemical Agency). 2012. "Guidance on information Requirements and Chemical Safety Assessment. Chapter R.8 : Characterisation of dose [concentration]-response for human health ". 186 pp. Disponible sur : https://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r8_en.pdf

EFSA (European Food Safety Authority). 2016. "Review and analysis of occurrence, exposure and toxicity of cyanobacteria toxins in food." Disponible sur : <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/sp.efsa.2016.EN-998/epdf>.

EFSA (European Food Safety Authority), 2017. "Update: use of the benchmark dose approach in risk assessment." ; 41pp. Disponible sur <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/4658>

Falconer, I. R., S. J. Hardy, A. R. Humpage, S. M. Froschio, G. J. Tozer, et P. R. Hawkins. 1999. "Hepatic and renal toxicity of the blue-green alga (cyanobacterium) *Cylindrospermopsis raciborskii* in male Swiss Albino mice." *Environmental Toxicology* 14 (1):143-150. doi: 10.1002/(SICI)1522-7278(199902)14:1<143::AID-TOX18>3.0.CO;2-H.

Falconer, I. R., et A. R. Humpage. 2001. "Preliminary evidence for in vivo tumour initiation by oral administration of extracts of the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii* containing the toxin cylindrospermopsin." *Environmental Toxicology* 16 (2):192-195. doi: 10.1002/tox.1024.

Fernández, D. A., M. C. Louzao, N. Vilariño, M. Fraga, B. Espiña, M. R. Vieytes, et L. M. Botana. 2014. "Evaluation of the intestinal permeability and cytotoxic effects of cylindrospermopsin." *Toxicol* 91:23-34. doi: 10.1016/j.toxicol.2014.08.072.

- Fessard, V., et C. Bernard. 2003. "Cell alterations but no DNA strand breaks induced in vitro by cylindrospermopsin in CHO K1 cells." *Environmental Toxicology* 18 (5):353-359. doi: 10.1002/tox.10136.
- Fonseca, A. L., A. Lankoff, S. M. F. O. Azevedo, R. M. Soares, et s. 2013. "Effects on DNA and cell viability of treated water contaminated with *Cylindrospermopsis raciborskii* extract including cylindrospermopsin." *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology* 8 (1):135-141. doi: 10.5132/eec.2013.01.020.
- Fonseca, A. L., J. Da Silva, E. A. Nunes, S. M. F. O. Azevedo, et R. M. Soares. 2014. "In vivo genotoxicity of treated water containing the cylindrospermopsin-producer *Cylindrospermopsis raciborskii*." *Journal of Water and Health* 12 (3):474-483. doi: 10.2166/wh.2014.087.
- Frosco, S. M., A. R. Humpage, P. C. Burcham, et I. R. Falconer. 2001. "Cell-free protein synthesis inhibition assay for the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin." *Environmental Toxicology* 16 (5):408-412. doi: 10.1002/tox.1050.
- Frosco, S. M., A. R. Humpage, P. C. Burcham, et I. R. Falconer. 2003. "Cylindrospermopsin-induced protein synthesis inhibition and its dissociation from acute toxicity in mouse hepatocytes." *Environmental Toxicology* 18 (4):243-251. doi: 10.1002/tox.10121.
- Frosco, S. M., A. R. Humpage, W. Wickramasinghe, G. Shaw, et I. R. Falconer. 2008. "Interaction of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin with the eukaryotic protein synthesis system." *Toxicon* 51 (2):191-198. doi: 10.1016/j.toxicon.2007.09.001.
- Frosco, S. M., E. Cannon, H. M. Lau, et A. R. Humpage. 2009. "Limited uptake of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin by Vero cells." *Toxicon* 54 (6):862-868. doi: 10.1016/j.toxicon.2009.06.019.
- Hercog, K., S. Maisanaba, M. Filipič, Á Jos, A. M. Cameán, et B. Žegura. 2017. "Genotoxic potential of the binary mixture of cyanotoxins microcystin-LR and cylindrospermopsin." *Chemosphere* 189:319-329. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.09.075.
- Humpage, A. R., M. Fenech, P. Thomas, et I. R. Falconer. 2000. "Micronucleus induction and chromosome loss in transformed human white cells indicate clastogenic and aneugenic action of the cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin." *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 472 (1-2):155-161. doi: 10.1016/S1383-5718(00)00144-3.
- Humpage, A. R., et I.R. Falconer. 2002. "Oral toxicity of *Cylindrospermopsis* : No Observed Adverse Effect Level Determination in Male Swiss Albino Mice." : The cooperative Research Centre for Water Quality and Treatment.
- Humpage, A. R., et I. R. Falconer. 2003. "Oral toxicity of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in male Swiss albino mice: Determination of no observed adverse effect level for deriving a drinking water guideline value." *Environmental Toxicology* 18 (2):94-103. doi: 10.1002/tox.10104.
- Humpage, A. R., F. Fontaine, S. Frosco, P. Burcham, et I. R. Falconer. 2005. "Cylindrospermopsin genotoxicity and cytotoxicity: Role of cytochrome P-450 and oxidative stress."

Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A 68 (9):739-753. doi: 10.1080/15287390590925465.

Kittler, K., D. Hurtaud-Pessel, R. Maul, F. Kolrep, et V. Fessard. 2016. "In vitro metabolism of the cyanotoxin cylindrospermopsin in HepaRG cells and liver tissue fractions." *Toxicol* 110:47-50. doi: 10.1016/j.toxicol.2015.11.007.

Kokocinski, M., A. M. Cameán, S. Carmeli, R. Guzman-Guillén, Á Jos, J. Mankiewicz-Boczek, J.S. Metcalf, I. M. Moreno, A.I. Prieto, et A. Sukenik. 2017. "Cylindrospermopsin and congeners." Dans *Handbook of cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis*, édité par Lisa Spooft and Geoffrey A.Codd Jussi Meriluoto. : John Wiley & Sons, Ltd.

Lankoff, A., A. Wojcik, H. Lisowska, J. Bialczyk, D. Dziga, et W. W. Carmichael. 2007. "No induction of structural chromosomal aberrations in cylindrospermopsin-treated CHO-K1 cells without and with metabolic activation." *Toxicol* 50 (8):1105-1115. doi: 10.1016/j.toxicol.2007.07.021.

López-Alonso, H., J. A. Rubiolo, F. Vega, M. R. Vieytes, et L. M. Botana. 2013. "Protein synthesis inhibition and oxidative stress induced by cylindrospermopsin elicit apoptosis in primary rat hepatocytes." *Chemical Research in Toxicology* 26 (2):203-212. doi: 10.1021/tx3003438.

Maire, M. A., E. Bazin, V. Fessard, C. Rast, A. R. Humpage, et P. Vasseur. 2010. "Morphological cell transformation of Syrian hamster embryo (SHE) cells by the cyanotoxin, cylindrospermopsin." *Toxicol* 55 (7):1317-1322. doi: 10.1016/j.toxicol.2010.01.025.

Máthé, C., M. M-Hamvas, T. Garda, D. Beyer, et G. Vasas. 2016. "Cellular effects of cylindrospermopsin (cyanobacterial alkaloid toxin) and its potential medical consequences." *Current Medicinal Chemistry* 24 (1):91-109. doi: 10.2174/0929867323666161028153814.

Moraes, A. C. N., et V. F. Magalhaes. 2018. "Renal tubular damage caused by cylindrospermopsin (cyanotoxin) in mice." *Toxicology Letters* 286:89-95. doi: 10.1016/j.toxlet.2017.12.028.

Neumann, C., P. Bain, et G. Shaw. 2007. "Studies of the comparative in vitro toxicology of the cyanobacterial metabolite deoxycylindrospermopsin." *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues* 70 (19):1679-1686. doi: 10.1080/15287390701434869.

Norris, R. L. G., A. A. Seawright, G. R. Shaw, M. J. Smith, R. K. Chiswell, et M. R. Moore. 2001. "Distribution of ¹⁴C cylindrospermopsin in vivo in the mouse." *Environmental Toxicology* 16 (6):498-505. doi: 10.1002/tox.10008.

Norris, R. L. G., A. A. Seawright, G. R. Shaw, P. Senogles, G. K. Eaglesham, M. J. Smith, R. K. Chiswell, et M. R. Moore. 2002. "Hepatic xenobiotic metabolism of cylindrospermopsin in vivo in the mouse." *Toxicol* 40 (4):471-476. doi: 10.1016/S0041-0101(01)00243-4.

OCDE (Organisation de coopération et de développement économiques). 2018. "Essai n° 408: Toxicité orale à doses répétées - rongeurs: 90 jours, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 4." Paris: OCDE.

- Pichardo, S., V. Devesa, M. Puerto, D. Vélez, et A. M. Cameán. 2017. "Intestinal transport of *Cylindrospermopsis* using the Caco-2 cell line." *Toxicology in Vitro* 38:142-149. doi: 10.1016/j.tiv.2016.09.021.
- Poniedzialek, B., P. Rzymiski, M. Kokocinski, et J. Karczewski. 2015. "Toxic potencies of metabolite(s) of non-*Cylindrospermopsis* producing *Cylindrospermopsis raciborskii* isolated from temperate zone in human white cells." *Chemosphere* 120:608-614. doi: 10.1016/j.chemosphere.2014.09.067.
- Reisner, M., S. Carmeli, M. Werman, et A. Sukenik. 2004. "The cyanobacterial toxin *Cylindrospermopsis* inhibits pyrimidine nucleotide synthesis and alters cholesterol distribution in mice." *Toxicological Sciences* 82 (2):620-627. doi: 10.1093/toxsci/kfh267.
- Rogers, E. H., R. D. Zehr, M. I. Gage, A. R. Humpage, I. R. Falconer, M. Marr, et N. Chernoff. 2007. "The cyanobacterial toxin, *Cylindrospermopsis*, induces fetal toxicity in the mouse after exposure late in gestation." *Toxicon* 49 (6):855-864. doi: 10.1016/j.toxicon.2006.12.009.
- Runnegar, M. T., S. M. Kong, Y. Z. Zhong, J. L. Ge, et S. C. Lu. 1994. "The role of glutathione in the toxicity of a novel cyanobacterial alkaloid *Cylindrospermopsis* in cultured rat hepatocytes." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 201 (1):235-241. doi: 10.1006/bbrc.1994.1694.
- Runnegar, M. T., S. M. Kong, Y. Z. Zhong, et S. C. Lu. 1995. "Inhibition of reduced glutathione synthesis by cyanobacterial alkaloid *Cylindrospermopsis* in cultured rat hepatocytes." *Biochemical Pharmacology* 49 (2):219-225. doi: 10.1016/S0006-2952(94)00466-8.
- Runnegar, M. T., C. Xie, B. B. Snider, G. A. Wallace, S. M. Weinreb, et J. Kuhlenkamp. 2002. "In vitro hepatotoxicity of the cyanobacterial alkaloid *Cylindrospermopsis* and related synthetic analogues." *Toxicological Sciences* 67 (1):81-87. doi: 10.1093/toxsci/67.1.81.
- Santé Canada. 2016. "Recommandations pour la qualité de l'eau potable – Les toxines cyanobactériennes dans l'eau potable – Document de consultation publique", 208pp.
- Seawright, A. A., C. C. Nolan, G. R. Shaw, R. K. Chiswell, R. L. Norris, M. R. Moore, et M. J. Smith. 1999. "The oral toxicity for mice of the tropical cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska)." *Environmental Toxicology* 14 (1):135-142. doi: 10.1002/(SICI)1522-7278(199902)14:1<135::AID-TOX17>3.0.CO;2-L.
- Shaw, G. R., A. A. Seawright, M. R. Moore, et P. K. S. Lam. 2000. "*Cylindrospermopsis*, a cyanobacterial alkaloid: Evaluation of its toxicologic activity." *Therapeutic Drug Monitoring* 22 (1):89-92. doi: 10.1097/00007691-200002000-00019.
- Shaw, G. R., A. A. Seawright, et M. R. Moore. 2001. "Toxicology and human health implications of the cyanobacterial toxin *Cylindrospermopsis*." Dans *Mycotoxins and Phycotoxins in Perspective at the turn of the Millenium*, édité par W. J. Dekoe, R. A. Samson et H. P. van Egmond, 435-443. Brazil: IUPAC & AOAC International.
- Shen, X., P. K. S. Lam, G. R. Shaw, et W. Wickramasinghe. 2002. "Genotoxicity investigation of a cyanobacterial toxin, *Cylindrospermopsis*." *Toxicon* 40 (10):1499-1501. doi: 10.1016/S0041-0101(02)00151-4.

- Sieroslawska, A. 2013. "Assessment of the mutagenic potential of cyanobacterial extracts and pure cyanotoxins." *Toxicon* 74:76-82. doi: 10.1016/j.toxicon.2013.07.029.
- Stewart, I., A. A. Seawright, P. J. Schluter, et G. R. Shaw. 2006. "Primary irritant and delayed-contact hypersensitivity reactions to the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* and its associated toxin cylindrospermopsin." *BMC Dermatology* 6. doi: 10.1186/1471-5945-6-5.
- Štraser, A., M. Filipič, et B. Žegura. 2011. "Genotoxic effects of the cyanobacterial hepatotoxin cylindrospermopsin in the HepG2 cell line." *Archives of Toxicology* 85 (12):1617-1626. doi: 10.1007/s00204-011-0716-z.
- Štraser, A., M. Filipič, et B. Žegura. 2013a. "Cylindrospermopsin induced transcriptional responses in human hepatoma HepG2 cells." *Toxicology in Vitro* 27 (6):1809-1819. doi: 10.1016/j.tiv.2013.05.012.
- Štraser, A., M. Filipič, M. Novak, et B. Žegura. 2013b. "Double strand breaks and cell-cycle arrest induced by the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in HepG2 cells." *Marine Drugs* 11 (8):3077-3090. doi: 10.3390/md11083077.
- Štraser, A., M. Filipič, I. Gorenc, et B. Žegura. 2013c. "The influence of cylindrospermopsin on oxidative DNA damage and apoptosis induction in HepG2 cells." *Chemosphere* 92 (1):24-30. doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.03.023.
- Sukenik, A., M. Reisner, S. Carmeli, et M. Werman. 2006. "Oral toxicity of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in mice: Long-term exposure to low doses." *Environmental Toxicology* 21 (6):575-582. doi: 10.1002/tox.20220.
- Terao, K., S. Ohmori, K. Igarashi, I. Ohtani, M. F. Watanabe, K. I. Harada, E. Ito, et M. Watanabe. 1994. "Electron microscopic studies on experimental poisoning in mice induced by cylindrospermopsin isolated from blue-green alga *Umezakia natans*." *Toxicon* 32 (7):833-843. doi: 10.1016/0041-0101(94)90008-6.
- US EPA (US Environmental Protection Agency). 2006. Harmonization in Interspecies Extrapolation : Use of BW^{3/4} as a Default Method in Derivation of the Oral RfD. Risk Assessment Forum Technical Panel External review draft, EPA/630/R-06/001 : 34pp, Washington DC.
- US EPA (US Environmental Protection Agency). 2015a. "Health effects Support Document for the Cyanobacterial Toxin Cylindrospermopsin " : 76 pp, juin 2015.
- US EPA (US Environmental Protection Agency). 2015b. "Drinking Water health Advisory for the cyanobacterial Toxin Cylindrospermopsin." : 67pp, juin 2015.
- Vichi, S., F. M. Buratti, et E. Testai. 2016. "Microcystins: Toxicological Profile." Dans *Marine and Freshwater Toxins*, édité par P. Gopalakrishnakone *et al.* : Springer Science+Business Media Dordrecht.
- Wimmer, K. M., W. K. Strangman, et J. L. C. Wright. 2014. "7-Deoxy-desulfo-cylindrospermopsin and 7-deoxy-desulfo-12-acetylcylindrospermopsin: Two new cylindrospermopsin analogs isolated from a Thai strain of *Cylindrospermopsis raciborskii*." *Harmful Algae* 37:203-206. doi: 10.1016/j.hal.2014.06.006.

Žegura, B., G. Gajski, A. Štraser, et V. Garaj-Vrhovac. 2011. "Cylindrospermopsin induced DNA damage and alteration in the expression of genes involved in the response to DNA damage, apoptosis and oxidative stress." *Toxicol* 58 (6-7):471-479. doi: 10.1016/j.toxicol.2011.08.005.

ANNEXES

Annexe 1 : Lettre de saisine



MINISTÈRE DES AFFAIRES SOCIALES ET DE LA SANTÉ

DIRECTION GÉNÉRALE DE LA SANTÉ
Sous-direction de la prévention des risques
liés à l'environnement et à l'alimentation
Bureau Qualité des eaux
DGS/EA4 n° 284

Béatrice JÉDOR
☎ : 01.40.56.45.99
beatrice.jedor@sante.gouv.fr

Boris GARRO
☎ : 01.40.56.57.35
boris.garro@sante.gouv.fr

Paris, le 19 JUL. 2016

Le Directeur général de la santé

à

Monsieur le Directeur général
de l'Agence nationale de sécurité sanitaire
de l'alimentation, de l'environnement
et du travail
Direction de l'Évaluation des Risques
(D.E.R.) - UERE
14 rue Pierre et Marie Curie
94701 MAISONS ALFORT CEDEX

OBJET : Demande d'actualisation de l'évaluation des risques liés à la présence de cyanobactéries et leurs toxines dans les eaux destinées à l'alimentation, à la baignade et autres activités récréatives

REF : DGS EA4 N° 160008 (numéro de dossier à rappeler dans toute correspondance)

En janvier 2001, le ministère chargé de la santé a saisi l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) afin d'effectuer une évaluation des risques liés à la présence de cyanobactéries dans les eaux destinées à la consommation humaine. En mars 2004, les ministères chargés de l'environnement et de la santé ont saisi l'Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail (Afsset) afin de procéder à l'évaluation des risques sanitaires encourus par les baigneurs et les autres usagers des plans et cours d'eau et de proposer des valeurs limites de qualité relatives à la concentration de cellules et/ou toxines dans les eaux de baignade. En juillet 2006, les deux agences ont publié un rapport commun¹ en réponse à ces deux saisines.

S'agissant de l'eau destinée à la consommation humaine (EDCH), les recommandations de l'Afssa de juillet 2006 sont appliquées par les Agences régionales de santé (ARS) pour gérer les risques sanitaires en cas d'efflorescence de cyanobactéries dans une retenue d'eau utilisée pour produire de l'EDCH. Depuis 2004, les analyses de cyanobactéries et cyanotoxines dans les eaux utilisées pour produire de l'eau potable et dans les EDCH se sont poursuivies en métropole et dans les départements d'Outre-mer. Des cyanobactéries potentiellement toxigènes ont récemment été observées dans des retenues utilisées pour produire de l'EDCH, à Mayotte notamment : *Cylindrospermopsis*, *Planktolyngbya*, *Aphanizomenon*, *Aphanothece*, *Dolichospermum*, *Pseudanabaena*, *Oscillatoria*. Ces cyanobactéries peuvent produire des cyanotoxines (anatoxine-a, saxitoxine, cylindrospermopsine, debormalplysiatoxine, aplysiatoxine, lipopolysaccharides,...) pour lesquelles aucune donnée sur une valeur sanitaire acceptable ne figure dans le rapport précité.

S'agissant des eaux de baignade, les recommandations de l'Afsset ont été mentionnées dans différentes circulaires élaborées par mes services. En février 2015, un groupe de travail composé d'agents d'Agences régionales de santé (ARS) concernées par cette problématique a été réuni par la

¹ Évaluation des risques liés à la présence de cyanobactéries et leurs toxines dans les eaux destinées à l'alimentation, à la baignade et autres activités récréatives ; Afssa - Afsset ; Juillet 2006

DGS afin de dresser un état des lieux concernant la gestion des risques sanitaires liés à la présence de cyanobactéries dans les eaux de baignade. Bien qu'il était fait état à cette occasion d'un nombre très limité d'effets sanitaires liés aux cyanobactéries, il apparaît des difficultés de gestion importantes liées notamment aux seuils de cyanobactéries entraînant une interdiction de la baignade. Le constat a également été fait que les ARS disposent désormais de nombreuses données relatives aux cyanobactéries et cyanotoxines dans les eaux de baignade susceptibles d'apporter un éclairage sur les niveaux de contamination en cyanobactéries. Ces données n'étaient pas disponibles lorsque l'Afsset avait réalisé son évaluation des risques en 2006.

Aussi, il apparaît opportun de solliciter l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail afin d'actualiser l'expertise de 2006 à la lumière des nouvelles connaissances scientifiques et des nombreuses données d'exposition accumulées par les ARS depuis une dizaine d'années. Le contexte ultra-marin devra être pris en considération.

En regard de ces nouvelles données, je vous demande donc :

- eu égard au niveau de risque sanitaire et des moyens de gestion existants, d'actualiser les valeurs limites de qualité relatives à la concentration de cyanobactéries (dénombrement cellulaire, biovolume ou tout autre indicateur pertinent) et/ou de toxines dans les eaux destinées à l'alimentation et les eaux de baignade, en particulier pour les cylindrospermopsine et saxitoxine ;
- d'actualiser la liste des espèces de cyanobactéries toxigènes.

Par ailleurs, la disparité observée dans les laboratoires agréés s'agissant des méthodes analytiques utilisées pour le prélèvement, le dénombrement et la détermination des cyanobactéries dans les eaux destinées à la consommation humaine, à la baignade et à autres activités récréatives soulèvent des difficultés importantes en termes d'interprétation et de gestion des risques sanitaires par les ARS. Aussi, l'expertise scientifique et technique du laboratoire d'hydrologie de Nancy a été sollicitée afin de réaliser un recensement et une évaluation des méthodes de prélèvement et d'analyses pour le dénombrement et la détermination des cyanobactéries dans les EDCH, les eaux de baignade et autres eaux récréatives. Cette expertise aboutira à des recommandations à destination des laboratoires et, à terme, permettra la rédaction d'un référentiel en concertation avec les organismes de normalisation, d'accréditation et les associations de laboratoires.

Cette saisine, qui fait partie du programme de travail 2016, est enregistrée à la Direction générale de la santé sous l'intitulé suivant :

**DEMANDE D'ACTUALISATION DE L'EVALUATION DES RISQUES LIES A LA
PRESENCE DE CYANOBACTERIES ET LEURS TOXINES DANS LES EAUX
DESTINEES A L'ALIMENTATION, A LA BAIGNADE ET AUTRES ACTIVITES
RECREATIVES**

et porte le numéro : 160008.

Je vous remercie de bien vouloir me transmettre, dans les meilleurs délais, votre proposition de contrat d'expertise comprenant notamment les modalités de traitement et de restitution des travaux, dont le rendu final est attendu pour la fin du 1^{er} semestre 2018 ; des premiers éléments issus de l'expertise, en particulier l'actualisation des valeurs limites, sont attendus d'ici fin 2017.

Le Directeur Général de la Santé,



Professeur Benoît VALLET

Annexe 2 : Recherche bibliographique sans restriction de date

Date de la recherche bibliographique : 01/03/2018 - 31/05/2018

Requête SCOPUS

TITLE-ABS-KEY

(toxicokinetic OR (absorption and ADME) OR (distribution and ADME) OR metabolism OR (excretion and ADME) OR ADME OR OATP OR transporters OR intestinal OR BBB OR "blood brain barrier" OR "placental barrier" OR "glutathione transferases" OR CYP OR "cytochrome P450" OR cytotoxicity OR toxicity OR "adverse effects" OR mortality OR genotoxicity OR carcinogenicity OR "reproductive toxicity" OR neurotoxicity OR immunotoxicity OR vitro OR "in vivo" OR liver OR kidney OR sperm OR ovary OR testicles OR thyroid OR brain OR "mode of action" OR mechanism OR "short-term" OR acute OR "long-term" OR chronic)

AND

(cylindrospermopsin*)

Requête PUBMED

ALL FIELDS

(toxicokinetic OR (absorption and ADME) OR (distribution and ADME) OR metabolism OR (excretion and ADME) OR ADME OR OATP OR transporters OR intestinal OR BBB OR "blood brain barrier" OR "placental barrier" OR "glutathione transferases" OR CYP OR "cytochrome P450" OR cytotoxicity OR toxicity OR "adverse effects" OR mortality OR genotoxicity OR carcinogenicity OR "reproductive toxicity" OR neurotoxicity OR immunotoxicity OR vitro OR "in vivo" OR liver OR kidney OR sperm OR ovary OR testicles OR thyroid OR brain OR "mode of action" OR mechanism OR "short-term" OR acute OR "long-term" OR chronic)

AND

(cylindrospermopsin*)

Annexe 3 : Evaluation de la qualité des études de toxicité subchronique par voie orale de la cylindrospermopsine

Reliability assessment of in vivo toxicity studies		
Study under evaluation		
Authors:		
	Chernoff <i>et al.</i> 2018	
Titel:		
	Cylindrospermopsin toxicity in mice following a 90-d oral exposure	
Testing facility, year, sponsor, study no. or bibliographic reference:		
	2018	
<p>Explanations are available for most criteria and show up, when the cursor is moved over the criteria field. Please read carefully!</p> <p>Red criteria: the maximum score is needed for these criteria to achieve reliability category 1 or 2 (see worksheet Explanations): Please evaluate with special care!</p>		
Criteria		
No.	Criteria Group I: Test substance identification	Score
1	Was the test substance identified?	1
2	Is the purity of the substance given?	1
3	Is information on the source/origin of the substance given?	1
4	Is all information on the nature and/or physico-chemical properties of the test item given, which you deem <u>indispensable</u> for judging the data (see explanation for examples)?	1
		4
Criteria Group II: Test organism characterisation		
5	Is the species given?	1
6	Is the sex of the test organism given?	1
7	Is information given on the strain of test animals plus, if considered necessary to judge the study, other specifications (see explanation for examples)?	0
8	Is age or body weight of the test organisms at the start of the study given?	1
9	For repeated dose toxicity studies only (give point for other study types): Is information given on the housing or feeding conditions?	1
		4
Criteria Group III: Study design description		
10	Is the administration route given?	1
11	Are doses administered or concentrations in application media given?	1
12	Are frequency and duration of exposure as well as time-points of observations explained?	1
13	Were negative (where required) and positive controls (where required) included (give point also, when absent but not required, see explanations for study types and their respective requirements on controls)?	1

14	Is the number of animals (in case of experimental human studies: number of test persons) per group given?	1
15	Are sufficient details of the administration scheme given to judge the study (see explanation for examples)?	1
16	For inhalation studies and repeated dose toxicity studies only (give point for other study types): Were achieved concentrations analytically verified or was stability of the test substance otherwise ensured or made plausible?	1
		7
	Criteria Group IV: Study results documentation	
17	Are the study endpoint(s) and their method(s) of determination clearly described?	1
18	Is the description of the study results for all endpoints investigated transparent and complete?	1
19	Are the statistical methods applied for data analysis given and applied in a transparent manner (give also point, if not necessary/applicable, see explanations)?	1
		3
	Criteria Group V: Plausibility of study design and results	
20	Is the study design chosen appropriate for obtaining the substance-specific data aimed at (see explanations for details)?	1
21	Are the quantitative study results reliable (see explanations for arguments)?	1
		2
		20
	A Numerical result leads to initial Category:	1
	B Checking red scores leads to revised Category:	1
	C Evaluator's proposal: Category:	
	D Justification in case evaluator deviates from B:	

Reliability assessment of in vivo toxicity studies	
Study under evaluation	
Authors:	Humpage et Falconer - Gavage
Titel:	Oral Toxicity of Cylindrospermopsin : No Observed Adverse Effect Level Determination in Male Swiss Albino Mice
Testing facility, year, sponsor, study no. or bibliographic reference:	2002
<p>Explanations are available for most criteria and show up, when the cursor is moved over the criteria field. Please read carefully!</p> <p>Red criteria: the maximum score is needed for these criteria to achieve reliability category 1 or 2 (see worksheet Explanations): Please evaluate with special care!</p>	

Criteria		
No.	Criteria Group I: Test substance identification	Score
1	Was the test substance identified?	1
2	Is the purity of the substance given?	0
3	Is information on the source/origin of the substance given?	1
4	Is all information on the nature and/or physico-chemical properties of the test item given, which you deem <u>indispensable</u> for judging the data (see explanation for examples)?	0
		2
	Criteria Group II: Test organism characterisation	
5	Is the species given?	1
6	Is the sex of the test organism given?	1
7	Is information given on the strain of test animals plus, if considered necessary to judge the study, other specifications (see explanation for examples)?	0
8	Is age or body weight of the test organisms at the start of the study given?	1
9	For repeated dose toxicity studies only (give point for other study types): Is information given on the housing or feeding conditions?	1
		4
	Criteria Group III: Study design description	
10	Is the administration route given?	1
11	Are doses administered or concentrations in application media given?	1
12	Are frequency and duration of exposure as well as time-points of observations explained?	1
13	Were negative (where required) and positive controls (where required) included (give point also, when absent but not required, see explanations for study types and their respective requirements on controls)?	1
14	Is the number of animals (in case of experimental human studies: number of test persons) per group given?	1
15	Are sufficient details of the administration scheme given to judge the study (see explanation for examples)?	0
16	For inhalation studies and repeated dose toxicity studies only (give point for other study types): Were achieved concentrations analytically verified or was stability of the test substance otherwise ensured or made plausible?	1
		6
	Criteria Group IV: Study results documentation	
17	Are the study endpoint(s) and their method(s) of determination clearly described?	1
18	Is the description of the study results for all endpoints investigated transparent and complete?	1
19	Are the statistical methods applied for data analysis given and applied in a transparent manner (give also point, if not necessary/applicable, see explanations)?	1
		3
	Criteria Group V: Plausibility of study design and results	
20	Is the study design chosen appropriate for obtaining the substance-specific data aimed at (see explanations for details)?	1
21	Are the <u>quantitative</u> study results reliable (see explanations for arguments)?	1
		2
		17

	A Numerical result leads to initial Category:	2
	B Checking red scores leads to revised Category:	2
	C Evaluator's proposal: Category:	
	D Justification in case evaluator deviates from B:	
Reliability assessment of in vivo toxicity studies		
Study under evaluation		
Authors:		
	Sukenik <i>et al.</i>	
Titel:		
	Oral toxicity of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in Mice : Long-term exposure to low doses.	
Testing facility, year, sponsor, study no. or bibliographic reference:		
	2006	
<p>Explanations are available for most criteria and show up, when the cursor is moved over the criteria field. Please read carefully!</p> <p>Red criteria: the maximum score is needed for these criteria to achieve reliability category 1 or 2 (see worksheet Explanations): Please evaluate with special care!</p>		
Criteria		
No.	Criteria Group I: Test substance identification	Score
1	Was the test substance identified?	1
2	Is the purity of the substance given?	0
3	Is information on the source/origin of the substance given?	1
4	Is all information on the nature and/or physico-chemical properties of the test item given, which you deem <u>indispensable</u> for judging the data (see explanation for examples)?	1
		3
Criteria Group II: Test organism characterisation		
5	Is the species given?	1
6	Is the sex of the test organism given?	1
7	Is information given on the strain of test animals plus, if considered necessary to judge the study, other specifications (see explanation for examples)?	0
8	Is age or body weight of the test organisms at the start of the study given?	1
9	For repeated dose toxicity studies only (give point for other study types): Is information given on the housing or feeding conditions?	1
		4
Criteria Group III: Study design description		
10	Is the administration route given?	1
11	Are doses administered or concentrations in application media given?	1
12	Are frequency and duration of exposure as well as time-points of observations explained?	1
13	Were negative (where required) and positive controls (where required) included (give point also, when absent but not required, see explanations for study types and their respective requirements on controls)?	1

14	Is the number of animals (in case of experimental human studies: number of test persons) per group given?	1
15	Are sufficient details of the administration scheme given to judge the study (see explanation for examples)?	1
16	For inhalation studies and repeated dose toxicity studies only (give point for other study types): Were achieved concentrations analytically verified or was stability of the test substance otherwise ensured or made plausible?	1
		7
	Criteria Group IV: Study results documentation	
17	Are the study endpoint(s) and their method(s) of determination clearly described?	1
18	Is the description of the study results for all endpoints investigated transparent and complete?	1
19	Are the statistical methods applied for data analysis given and applied in a transparent manner (give also point, if not necessary/applicable, see explanations)?	1
		3
	Criteria Group V: Plausibility of study design and results	
20	Is the study design chosen appropriate for obtaining the substance-specific data aimed at (see explanations for details)?	0
21	Are the quantitative study results reliable (see explanations for arguments)?	1
		1
		18
	A Numerical result leads to initial Category:	1
	B Checking red scores leads to revised Category:	3
	C Evaluator's proposal: Category:	
	D Justification in case evaluator deviates from B:	

Annexe 4 : Modélisation d'une BMD pour la cylindrospermopsine



Maisons-Alfort, le 26 juillet 2018

NOTE d'appui scientifique et technique de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

relatif à « la vérification d'une modélisation de la benchmark dose sur la cylindrospermopsine »

L'Unité Méthodologie et Etudes (UME) a reçu une demande d'appui scientifique et technique (AST) interne le 12 juillet 2018 de l'Unité UERE de la Direction de l'Evaluation des Risques (DER) de l'Anses relatif à la vérification d'une modélisation de la benchmark dose sur la cylindrospermopsine (2018-ASTDER-22).

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA DEMANDE

La demande d'AST porte sur la vérification des calculs de la « benchmark dose » et plus particulièrement de la valeur inférieure de son intervalle de confiance, la BMDL, réalisée précédemment sur la cylindrospermopsine à partir de données expérimentales sur des souris CD-1 avec pour effet critique l'augmentation relative du poids du foie (Chernoff *et al.*, 2018).

A partir des données de l'étude retenue, une BMDL a été calculée auparavant à l'aide du logiciel de l'Efsa (<https://efsa.openanalytics.eu/app/bmd>), à partir des hypothèses suivantes :

- intervalle de confiance à 90% autour de la BMD
- taille d'effet critique de 5%

2. ORGANISATION DES TRAVAUX

En refaisant les calculs de la BMDL à partir des mêmes données et des mêmes hypothèses à l'aide de l'outil de l'Efsa, on obtient les mêmes résultats que ceux obtenus précédemment (Figure 1).

En revanche, il faut noter qu'avec une taille d'effet critique de 5% la BMD se trouve dans la zone entre la dose témoin (de 0 ug.kg⁻¹) et la première dose (75 ug.kg⁻¹) mais très proche de la dose témoin. Or, comme les trois autres doses sont encore plus éloignées de la dose témoin, le modèle obtenu est nécessairement très incertain pour la zone autour de la valeur de la BMD.

Appui scientifique et technique de l'Anses
Demande n° « 2018-ASTDER-12 »

On peut voir graphiquement sur la figure 1 : la BMD calculée est à 2.32 ug.kg⁻¹ ou à 1.67 ug.kg⁻¹ selon le modèle choisi (exponentiel ou de Hill), ce qui correspond en log10 à 0.36 et 0.22, respectivement. On se trouve ainsi dans la zone en pointillé à gauche de la figure qui est obtenue par simple extrapolation linéaire et donc, très incertaine.

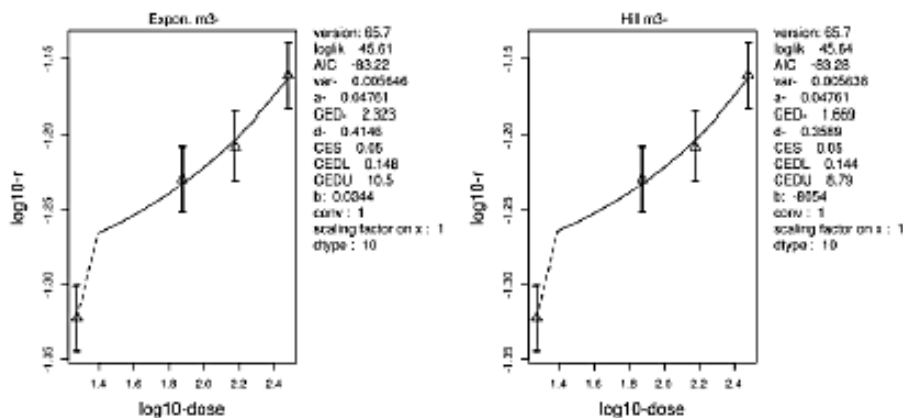


Figure 1 : modélisation de la relation dose réponse, en log10, à partir d'un modèle exponentiel (à gauche) ou de Hill (à droite).

Une taille d'effet critique de 5% pour une augmentation relative de poids du foie peut être discutée dans la mesure où de fortes variations de ce paramètre peuvent intervenir sans qu'il s'agisse d'un effet néfaste. On peut aussi proposer de la passer à 10% puisqu'il s'agit également d'une valeur classique pour la construction d'une BMDL.

Dans ce cas, on utilise logiquement exactement le même ajustement des deux modèles retenus, les valeurs de la BMD obtenus sont recensées dans la Table 1.

Table 1 : Valeurs de BMDL, BMDU et BMD (en ug.kg⁻¹) obtenues par la modélisation de la relation dose-réponse.

model	BMDL	BMDU	BMD
Expon. m3-	1.9	32.7	11.68
Hill m3-	1.89	30.6	10.11

Donc, même en augmentant la taille de l'effet, on est toujours dans la zone d'extrapolation simple du modèle (ligne en pointillé) car la log10(dose) est égale à log10(11.68)=1.07 et à log10(10.11)=1 respectivement.

Appui scientifique et technique de l'Anses
Demande n° « 2018-ASTDER-12 »**3. ANALYSE ET CONCLUSIONS**

En conclusion, les calculs de la BMDL précédents ont effectivement été correctement réalisés selon le logiciel de l'Efsa. Cependant, la modélisation de la BMD n'est pas recommandée à partir uniquement des données de l'étude retenue ici (Chernoff *et al.*, 2018) avec un effet critique de 5% ou même 10 % d'augmentation relative du poids du foie car le protocole expérimental n'est pas adapté à un tel effet critique et l'incertitude autour des résultats de la modélisation de la BMD est donc très forte.

4. REFERENCES

N. Chernoff, D.J. Hill, I. Chorus, D.L. Diggs, H. Huang, D. King, J.R. Lang, T.-T. Le, J.E. Schmid, G.S. Travlos, E.M. Whitley, R.E. Wilson & C.R. Wood (2018): Cylindrospermopsin toxicity in mice following a 90-d oral exposure, *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, DOI: 10.1080/15287394.2018.1460787

Notes



Agence nationale de sécurité sanitaire
de l'alimentation, de l'environnement et du travail
14 rue Pierre et Marie Curie
F94701 Maisons-Alfort cedex
www.anses.fr
[@Anses_fr](https://twitter.com/Anses_fr)