

# RAPPORT D'ACTIVITÉ 2019

## Laboratoire de Fougères



# Présentation

L'expérience des soixante-et-un agents du Laboratoire de Fougères est reconnue dans les domaines de l'analyse des résidus de médicaments vétérinaires et de biocides dans les produits animaux, la modélisation du devenir et des effets des médicaments vétérinaires, l'évaluation des effets antibactériens et la caractérisation de dangers toxicologiques pour la santé humaine des contaminants d'origine naturelle (toxines) ou associés aux activités humaines (produits phyto-sanitaires, nanomatériaux). Ces savoir-faire contribuent à la surveillance de dangers dans le cadre de ses mandats de référence :

laboratoire national de référence pour les résidus de médicaments vétérinaires et pour la résistance aux antibiotiques, laboratoire de référence de l'Union européenne pour les résidus d'antibiotiques et de colorants à activité pharmacologique. Les connaissances acquises dans le cadre de ses projets de recherches, nationaux ou européens, sont utilisées pour progresser dans l'évaluation des risques via l'expertise de ses scientifiques. Le laboratoire est en charge de la plateforme d'analyse statistique et de la plateforme d'analyse d'images à haut contenu informatif de l'Anses.

« Le Laboratoire est en charge de la plateforme d'analyse statistique et de la plateforme d'analyse d'images à haut contenu informatif. »

# Contexte

Début 2019, l'Anses a signé une convention de partenariat avec l'Université de Rennes autour de la constitution d'un groupe de recherche et d'expertise sur l'exposome (Greex). L'exposome se définit comme l'ensemble des expositions à des agents biologiques, chimiques et physiques ayant un effet sur notre santé tout au long de notre vie. Les progrès dans le domaine de l'analyse physico-chimique renforcent la capacité à recueillir de plus en plus d'informations sur ces expositions tandis que ceux en biologie permettent de caractériser leurs effets au niveau cellulaire. L'accroissement des connaissances en biologie sur le fonctionnement des organes et organismes modifie notre manière d'appréhender les notions de dangers et de risques et la façon de les étudier. Nos travaux sont menés sur les médicaments

vétérinaires et leurs résidus, l'influence des antibiotiques et des désinfectants sur la résistance aux antibiotiques, la caractérisation du devenir des substances au niveau cellulaire et la mesure des effets toxiques *in vitro* et *in vivo*. Le Laboratoire de Fougères exploite des technologies recueillant de plus en plus de données dont l'analyse et la compréhension sont permises par les capacités croissantes de calcul et de modélisation informatique. Ces travaux contribuent à caractériser différentes étapes de la chaîne d'événements menant de l'exposition à une ou des substances à la survenue d'effets indésirables. Le Laboratoire déploie avec ses partenaires ces outils et méthodes afin de contribuer à une évaluation du risque toxique selon les concepts de la toxicologie du 21<sup>e</sup> siècle.

## CHIFFRES-CLÉS

**545** rapports d'analyse émis

**5** rapports d'EILA terminés

**27** publications dans des revues A et A+

**4** thèses en cours

# Travaux réalisés et faits marquants

## BIOCIDES DÉINFECTANT - RÉSISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

Le projet Listadapt (2019-2020) financé dans le cadre du programme conjoint européen *One Health* vise à décrypter les mécanismes de l'adaptation de *Listeria monocytogenes* (Lm) à différentes niches écologiques (sol, aliment, animal, environnement). Les génomes de 2000 souches de Lm ont été séquencés et analysés pour identifier des marqueurs génétiques de l'adaptation. Le laboratoire de Fougères, responsable d'un *workpackage*, a mené des travaux plus particulièrement sur la caractérisation phénotypique de la sensibilité des souches de *L. monocytogenes* à des antibiotiques et des biocides. Parmi les résultats marquants, l'exposition *in vitro* de *L. monocytogenes* à des ammoniums quaternaires, largement utilisés comme désinfectants en industrie agro-alimentaire conduit à une augmentation stable pour une dizaine de souches de la résistance à un antibiotique (ciprofloxacine) de la famille des céphalosporines de

3<sup>e</sup> génération. D'autres tests phénotypiques sur les capacités d'adhésion, de formation de biofilms et de survie dans différents systèmes de laboratoire sont réalisés par les autres partenaires du projet. Une étude d'association est en cours pour identifier les corrélations entre les données phénotypiques et génotypiques.

Dans le cadre d'un stage de master, l'exposition à un autre composé biocide (polyhexaméthylène biguanide) a montré l'apparition d'un morphotype de taille réduite et de résistance à la gentamicine chez des souches d'*Escherichia coli* cultivées en biofilms. Le séquençage de ce variant phénotypique en parallèle du sauvage a permis la détection d'une mutation non-sens. Des analyses du niveau d'expression différentiel de certains gènes sont en cours pour relier cette mutation au phénotype observé afin de mieux comprendre le mécanisme d'adaptation de ces souches d'*Escherichia coli*.

## TOXICOLOGIE

### SECURITIVE

L'unité Toxicologie des contaminants s'est associée à l'unité Expérimentation, modélisation, analyse de données dans un projet financé par la région Bretagne dans un double objectif : développer un modèle de macrofluidique en toxicologie cellulaire et des outils d'extrapolation de l'*in vitro* à l'*in vivo* (IVIVE) dans le cadre de la caractérisation du danger des contaminants alimentaires. Ces travaux ont permis de définir les paramètres toxicocinétiques *in vitro* d'une mycotoxine émergente, l'Enniatine-B, qui vont alimenter les outils de simulation PK-Sim® et Simcyp®, permettant les extrapolations IVIVE.

« L'unité Toxicologie des contaminants s'est associée à l'unité Expérimentation, modélisation, analyse de données dans un projet financé par la région Bretagne. »

## 47<sup>e</sup> CONGRÈS DE LA SOCIÉTÉ EUROPÉENNE DE MUTAGENÈSE ENVIRONNEMENTALE ET DE GÉNOMIQUE

Organisé par la Société française de toxicologie génétique sous la présidence d'un scientifique du laboratoire et avec la participation active de nos collègues de l'Institut de recherche en santé, environnement et travail de Rennes, le 47<sup>e</sup> congrès de la Société européenne de mutagenèse environnementale et de génomique (EEMGS) a réuni plus de deux cents scientifiques au sein de l'École des hautes études en santé publique de Rennes pendant quatre jours, en mai 2019, sur le thème « *Genotoxicology and cancer: Science challenges solved by transdisciplinary collaboration* ». Ce congrès a été l'occasion d'assister à des conférences

plénières exceptionnelles, en particulier celle de Christian Tomasetti de l'université Johns-Hopkins (USA) sur « *Stem cell divisions, cancer etiology, and mutational signatures* », et celle de Kristine Witt du NIEHS (USA) sur « *Bridging traditional genetic toxicology and high throughput screening approaches: the Tox21 program* ». Quatorze sessions scientifiques, soixante-dix orateurs, deux sessions posters et deux ateliers ont animé ce congrès. Il a permis de mettre l'accent sur la position internationale de l'unité de toxicologie du Laboratoire de Fougères dans le domaine de la toxicologie génétique.

## RÉSIDUS DE MÉDICAMENTS VÉTÉRINAIRES

Dans le cadre de ses missions de référence, le Laboratoire a réalisé le développement et la validation de plusieurs méthodes analytiques par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem. Parmi celles-ci, une méthode permettant la confirmation des résidus de nitrofurannes incluant le nifursol a été validée dans les viandes et les poissons à des niveaux compatibles avec les nouvelles limites réglementaires « RPA » applicables en 2022 (Reg (UE) 2019/1871) ; cette méthode sera mise en œuvre dans le réseau français pour les plans de surveillance et les plans de contrôle en 2021. Une autre

méthode dédiée à l'analyse de la colistine A et de la colistine B et de la bacitracine A dans les aliments pour animaux a également été développée et validée pour la recherche de contaminations croisées dans les aliments. Dans une perspective d'évolution des méthodes de surveillance, une méthode mettant en œuvre la spectrométrie de masse haute résolution sur le système Q-Exacte Plus a été développée et validée pour dépister plus de 150 médicaments vétérinaires (antibactériens, antiparasitaires, tranquillisants et anti-inflammatoires non stéroïdiens) dans la matrice muscle à des niveaux résiduels.

**« Une méthode permettant la confirmation des résidus de nitrofurannes incluant le nifursol a été validée dans les viandes et les poissons. »**

### MARS

→ Signature de la convention de partenariat avec l'Université Rennes 1 – Groupement de recherches et d'expertise sur l'exposome, Rennes

### MAI

→ Co-organisation avec l'IRSET - *Congress European Environmental Mutagenis & Genomic Society*, Rennes

# Perspectives et projets engagés ↙

Financé par le plan EcoAntibio, le projet ECOPLUME vise à évaluer l'occurrence des résidus d'antibiotiques dans les plumes d'animaux d'élevage et de leurs produits dérivés. Il permettra de caractériser le niveau d'exposition et les risques induits pour la chaîne alimentaire et l'environnement. Un doctorant a démarré sa thèse dans le cadre de ce projet au sein de l'unité Analyse des résidus et contaminants.

Le Laboratoire de Fougères, associé au sein de l'Anses, au Laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort, à la Direction de l'évaluation des produits réglementés, à plusieurs centres techniques (ITAVI et ACTIA) et à la Mutualité sociale agricole, participe au projet ADapt (2019-2022) pour utiliser mieux et moins de produits biocides désinfectants dans les filières avicole et piscicole. Pour répondre à ces objectifs, le projet s'appuie sur des enquêtes de terrain permettant de relever les pratiques d'utilisation des biocides pouvant être les plus problématiques pour la santé des travailleurs et de l'environnement. Le Laboratoire de Fougères en collaboration avec le centre technique ACTALIA débutera en 2020 des travaux pour optimiser des pratiques et tester des méthodes complémentaires à l'utilisation des désinfectants. Des tests d'efficacité de ces méthodes optimisées sur des indicateurs bactériens seront réalisés en conditions standardisées de laboratoire et dans des conditions proches de terrain, en hall pilote.

Dans le cadre des appels à manifestation d'intérêt, un projet sur l'évaluation quantitative de la variabilité d'excrétion de *Salmonella* et l'impact de l'utilisation des biocides sur le développement de résistance aux antibiotiques après nettoyage

## « Des tests d'efficacité de ces méthodes optimisées sur des indicateurs bactériens seront réalisés. »

ou désinfection en élevage de porcs réunit trois unités (AB2R, EPISABE, HQPAP) des laboratoires de l'Anses et l'unité d'évaluation de l'efficacité des biocides de la Direction de l'évaluation des produits réglementés. Les données sur la quantification de *Salmonella*, jusqu'à présent quasi-inexistantes, permettront d'alimenter l'analyse quantitative des risques à la Direction de l'évaluation des risques. Ces travaux réalisés dans les conditions du terrain permettront de déterminer s'il existe ou non un lien entre l'usage des biocides et la résistance aux antibiotiques.

Dans le cadre d'un projet, financé par l'Agence nationale de la recherche, sur le lien potentiel entre l'exposition au déoxyvalérol (DON), une mycotoxine rencontrée dans les aliments, et les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, deux unités du Laboratoire de Fougères sont particulièrement impliquées. Les unités Expérimentation, modélisation et analyses de données et Antibiotiques, biocides, résidus et résistance sont chargées d'étudier la réciprocity des effets intestinaux du DON sur la composition du microbiote intestinal humain, le métabolisme du DON

et les conséquences de son exposition en termes d'homéostasie immunitaire à l'aide d'un modèle de souris gnotobiotiques humanisées, colonisées par un microbiote sain ou par le microbiote d'un patient atteint de la maladie de Crohn. Les études sont en cours de réalisation et l'ensemble des résultats devraient être disponibles en fin d'année 2020.

Dans le cadre de son activité de référence européenne sur les résidus de médicaments vétérinaires et en appui à la Commission européenne (DG-SANTE), le Laboratoire de Fougères, en collaboration avec les laboratoires de référence du *Federal Office of consumer protection and food safety* (BVL, Allemagne) et du *Wageningen Food Safety Research* (WFSR, Pay-Bas), contribue à la mise en place pour une entrée en vigueur en 2022 des nouveaux règlements d'application du règlement « OCR » (Reg (UE) 2017/625). Ce travail fait suite à l'abrogation par le règlement « OCR » de la Directive (CE) 96/23 qui concernait la mise en œuvre des plans nationaux annuels de contrôle officiel des substances vétérinaires dans les denrées d'origine animale. Un travail parallèle important est également engagé par les trois laboratoires de référence (Berlin, Fougères, Wageningen) en relation avec leurs réseaux européens de LNRs présents dans les vingt-sept pays membres sur une révision de la Décision (CE) 2002/657. Cette réglementation couvre l'ensemble des critères de performances analytiques des méthodes utilisables en contrôle officiel et doit être mise à jour pour utilisation dans les plans nationaux de contrôle dès 2022.

### JUIN

→ Co-organisation, dans le cadre du LRUE avec l'AOAC-Europe/NMKL/NordVal du Congrès International « Speeding towards ... Omics », Oslo

### JUIN

→ Atelier du laboratoire européen de référence, Résidus d'antibiotiques et colorants, Fougères

### SEPTEMBRE

→ Atelier du laboratoire national de référence Résidus de médicaments vétérinaires, Fougères

---

## LE PROJET ECOANTIBIO 2017 BRAVO

→ Le projet EcoAntibio 2017 BRAVO *Impact des biocides sur l'écologie microbienne et la résistance aux antibiotiques en abattoirs de porcs* associait l'Institut de l'élevage du porc et le Laboratoire de Fougères. Il a permis une étude longitudinale du suivi de l'évolution de la contamination bactérienne et de la résistance aux antibiotiques de *Salmonella* au niveau de six sites de prélèvements d'un abattoir de porcs avant et après des opérations de nettoyage et désinfection. Parmi les cinq principaux sérotypes identifiés, les souches de *Salmonella* monophasique sont le plus souvent retrouvées (58 %). Des souches de *Salmonella* de différents sérotypes persistantes sont isolées à différents sites et à différentes dates. Les traitements hygiéniques n'impactent pas la résistance aux antibiotiques des souches de *Salmonella* et ne modifient pas la relative stabilité des populations bactériennes majoritaires aux différentes dates de prélèvements avant et après nettoyage et désinfection. Ces travaux ont été valorisés dans *Scientific Reports*. (<https://www.nature.com/articles/s41598-019-49464-8>).

---

---

## Tox publication scientific report

### LES MODÈLES 3D À L'HONNEUR

→ Les travaux de l'unité Toxicologie des contaminants sur le développement d'un test de génotoxicité utilisant un modèle tridimensionnel de cellules hépatiques humaines (sphéroïdes de cellules HepaRG) ont fait l'objet en 2019 d'une publication dans la revue en ligne *Scientific Reports*, publiée par *Nature*. Ces travaux sont une avancée majeure dans le développement de modèles cellulaires *in vitro* plus prédictifs de la toxicité chez l'Homme, dans la perspective de remplacer, en partie ou en totalité, les études chez l'animal à plus ou moins long terme. Ils ont été réalisés grâce au soutien de la région Bretagne qui a financé les dix-huit mois du contrat post-doctoral. Ils sont le résultat d'une collaboration entre les unités Toxicologie des contaminants et Analyse des résidus de contaminants, pour la partie caractérisation des activités P450 des sphéroïdes. Le modèle 3D de sphéroïdes HepaRG développé ici au cours de ce projet est apparu plus prédictif que le modèle 2D et des travaux sont à poursuivre pour déterminer la plus-value de ce modèle dans l'identification et la caractérisation des composés génotoxiques chez l'Homme.

---

## APPLICATIONS DE LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE HAUTE RÉOLUTION POUR LE CONTRÔLE FUTUR DES RÉSIDUS

→ Le Laboratoire a publié deux études mettant en œuvre la spectrométrie de masse haute résolution en approche non ciblée. Dans un travail mené chez la truite sur le métabolisme d'un colorant à activité pharmacologique, l'approche non ciblée a permis d'étudier le devenir du colorant étudié et la formation des métabolites non connus à l'origine mais suspectés d'être présents sur la base de travaux menés *in vitro*. Un autre travail, mené cette fois chez la volaille sur l'effet d'un traitement avec une céphalosporine sur l'ensemble des métabolites observés au niveau fécal et hépatique, a lui étudié les voies métaboliques perturbées par l'application du traitement. Ce premier travail est destiné à l'identification de biomarqueurs qui permettrait de discriminer les animaux traités des animaux non-traités. Ces travaux publiés sont des étapes essentielles dans l'appropriation des nouvelles méthodes notamment de traitements statistiques des données par l'unité Analyse des résidus et contaminants.

# PRINCIPALES PUBLICATIONS

- ZEKAR, F.M., GRANIER S.A., TOUATI, A. AND MILLEMANN Y. (2019) Occurrence of Third-Generation Cephalosporins-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in Fresh Fruits and Vegetables Purchased at Markets in Algeria. *Microbial Drug Resistance* <https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0249>
- WASNIEWSKI M, LAURENTIE M, RIZZO F, SERVAT A, AUBERT M, CLIQUET F Pro-ficiency test for rabies serology: A design complying with international standards for a reliable assessment of participating laboratories. *PLoS Negl Trop Dis*, 2019, 13 (12): e0007824. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007824>
- A. BRIDIER, P. LE GRANDOIS, MH. MOREAU, C. PRÉNOM, A. LE ROUX, C. FEURER, C. SOUMET. Impact of cleaning and disinfection procedures on microbial ecology and *Salmonella* antimicrobial resistance in a pig slaughterhouse. *Scientific reports* 9 (1), 1-13 (2019)
- DUBREIL, E., S. MOMPÉLAT, V. KROMER, Y. GUITTON, M. DANION, T. MORIN, D. HURTAUD-PESSEL AND E. VERDON (2019). «Dye residues in aquaculture products: Targeted and metabolomics mass spectrometric approaches to track their abuse.» *Food Chemistry* 294: 355-367.
- BRAUGE T., MIDELET-BOURDIN G., SOUMET C. (2018) Viability detection of foodborne bacterial pathogens in food environment by PMA-qPCR and by microscopic observation. *Methods Mol Biol* 1918, 117-128.
- GAUGAIN, M., S. MOMPÉLAT, M. P. FOURMOND, J. MANCEAU, J. G. ROLLAND, M. LAURENTIE, E. VERDON, L. BELLANGER AND D. HURTAUD-PESSEL (2019). «A non-targeted LC-HRMS approach for detecting exposure to illegal veterinary treatments: The case of cephalosporins in commercial laying Hens.» *Journal of Chromatography A* 1599: 161-171.
- BRIDIER, A. (2018) Exploring foodborne pathogen ecology and antimicrobial resistance in the light of shotgun metagenomics A. *Methods Mol Biol*, 1918, 229-245.
- GAUDIN, V. (2019) Receptor-based electrochemical biosensors for the detection of contaminants in food products, in *Electrochemical Biosensors.*, Elsevier. p. 307-365.



*Connaître, évaluer, protéger*

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

Laboratoire de Fougères  
10 B rue Claude Bourgelat - Javené  
CS 40608  
35306 Fougères Cedex

**[www.anses.fr](http://www.anses.fr)**

**[@Anses\\_fr](https://twitter.com/Anses_fr)**