

## **AVIS**

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

**relatif à une demande d'appui scientifique et technique pour l'analyse d'une étude  
publiée en 2013 entrant dans le cadre du dossier des substances actives  
phytopharmaceutiques « Composés du cuivre ».**

---

*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 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 rendus publics.*

---

L'Anses a été saisie le 7 novembre 2013 par la Direction générale de l'alimentation (DGAI) d'une demande d'appui scientifique et technique pour l'analyse d'une étude publiée en 2013, faisant état d'une toxicité potentielle du cuivre en lien avec la maladie d'Alzheimer.

#### **1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE**

Dans le processus européen d'évaluation des substances actives phytopharmaceutiques (règlement (CE) N°1107/2009<sup>1</sup>), la France est l'Etat membre rapporteur pour les substances actives regroupées sous la dénomination « Composés du cuivre ». Suite à l'évaluation réalisée par l'Anses, l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA) a publié les conclusions de sa revue par les pairs en 2008 (EFSA 2008).

Les « composés du cuivre » ont été inscrits le 1<sup>er</sup> décembre 2009<sup>2</sup> à l'annexe I de la directive 91/414/CEE avec une demande de données confirmatives, dont l'évaluation par l'Anses a été finalisée et transmise à la Commission Européenne courant 2012. La revue européenne de l'EFSA sur les données confirmatives a été publiée en 2013 (EFSA 2013).

Une étude scientifique a été publiée en 2013 dans la revue PNAS (Singh *et al.* 2013). Cet article rapporte les résultats d'une série d'expérimentations visant à élucider les mécanismes d'accumulation cérébrale de  $\beta$ -amyloïde induite par de faibles doses orales de cuivre.

Dans ce contexte, l'Anses a été saisie par la DGAI afin de recueillir l'analyse de la publication de Singh *et al.*, 2013. L'Anses est interrogée notamment sur les points suivants :

---

<sup>1</sup> Règlement (CE) n° 1107/2009 du Parlement européen et du Conseil du 21 octobre 2009 concernant la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques et abrogeant les directives 79/117/CEE et 91/414/CEE du Conseil.

<sup>2</sup> Directive 2009/37/CE de la Commission du 23 avril 2009 modifiant la directive 91/414/CEE du Conseil pour y inclure le chlormequat, les composés de cuivre, le propaquizafop, le quizalofop-P, le teflubenzuron et la zéta-cyperméthrine comme substances actives, OJ No L 104, 24.4.2009, p. 23-32.

- la justification scientifique d'un lien entre l'exposition au cuivre et ses composés et la maladie d'Alzheimer ;
- la comparaison entre les niveaux de cuivre utilisés dans l'étude et ceux utilisés dans le cadre des études de toxicité incluses dans le dossier des substances actives ;
- la comparaison entre les niveaux de cuivre utilisés dans l'étude et ceux auxquels les opérateurs, les travailleurs agricoles, les résidents et les consommateurs peuvent être exposés.

## 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 a été réalisée par la Direction des produits réglementés de l'Anses et le Comité d'experts spécialisé "Produits phytopharmaceutiques : substances et préparations chimiques" a été consulté le 25 mars 2014.

## 3. ANALYSE

### Points marquants de la publication

La publication étudie les effets de l'exposition à de faibles doses de cuivre administré par voie orale à des souris de laboratoire normales (i.e. non transgénique) et à un modèle de souris transgéniques qui expriment une protéine  $\beta$ -amyloïde ( $A\beta$ ) humaine mutée.

L'étude montre, chez la souris normale âgée non exposée au cuivre, l'accumulation de cuivre dans les capillaires cérébraux, mais pas dans le parenchyme cérébral, ainsi qu'une réduction du niveau de la protéine LRP1 (low density lipoprotein receptor-related protein 1) associée à une augmentation du niveau de protéine  $\beta$ -amyloïde.

L'exposition chronique par voie orale, à de faibles teneurs de cuivre à partir de l'âge de 2 mois reproduit et accélère ces effets, impliquant également une réduction de LRP1 dans les capillaires cérébraux. Les travaux réalisés *in vitro* confortent ces résultats, en reproduisant, avec un effet dose-dépendant, des changements similaires, dans des cellules endothéliales murines ou humaines, exposées à des taux de cuivre similaires aux taux plasmatiques normaux de cuivre labile. Ils suggèrent par ailleurs que la réduction de LRP1 est au moins en partie liée à une interaction cuivre-LRP1-protéine prion, à sa nitrotyrosination et à sa dégradation protéosomale.

Dans le modèle de souris transgéniques qui expriment une forme mutée de la protéine humaine précurseur de l' $A\beta$  (dite APP, pour « Amyloid Precursor Protein »), l'exposition au cuivre par voie orale à partir de l'âge de 6 mois, entraîne également une augmentation de la teneur en cuivre dans les capillaires cérébraux, mais aussi dans le parenchyme cérébral, entraînant une accumulation d' $A\beta$  associée à une diminution du taux de LRP1 dans les cellules endothéliales ainsi qu'à un état de stress oxydatif cérébral et à une neuroinflammation.

En conclusion, ces travaux représentent des études mécanistiques très fondamentales, qui indiquent que l'augmentation d' $A\beta$  observée dans le cerveau est liée à la réduction de la protéine LRP1, transporteuse de l' $A\beta$ . Ils suggèrent que l'action sélective du cuivre sur le récepteur d'endocytose LRP1 peut contribuer à aggraver ou à accélérer de la maladie d'Alzheimer. Un des intérêts principaux de l'étude de Singh *et al.* est de se focaliser sur un modèle animal normal (souris jeune ou âgée) d'exposition à de faibles doses de cuivre pour en évaluer les effets sur l'un des mécanismes impliqués dans le progression de la maladie. Ces analyses sont confortées par des analyses *in vitro* et *in vivo* dans un modèle de souris transgéniques, tout en soulignant la difficulté d'interprétation des résultats dans de tels modèles.

**Justification scientifique d'un lien entre l'exposition au cuivre et ses composés et la maladie d'Alzheimer**

En pathologie humaine, de nombreux travaux impliquent une contribution des métaux dans l'origine des maladies neurodégénératives humaines, et notamment celle du cuivre dans la maladie d'Alzheimer (Jellinger 2013). De nombreuses études ont rapporté une augmentation du cuivre labile (non lié à la céruloplasmine) dans les régions cérébrales les plus atteintes et le plasma (Squitti and Polimanti 2013), et son association avec le déclin cognitif surtout chez les patients hyperlipidémiques (Squitti *et al.* 2009). Les plaques amyloïdes, l'une des caractéristiques lésionnelles de la maladie, contiennent du cuivre, mais également du zinc et du fer. Certaines études épidémiologiques ont montré un déclin cognitif accéléré associé à un apport alimentaire en cuivre élevé, plus évident lors d'un apport également élevé en graisses hautement saturées et trans (Morris *et al.* 2006). Les altérations de l'homéostasie du cuivre et l'hypercholestérolémie ont ainsi été identifiées indépendamment comme des facteurs de risque et synergiques de la maladie (Hung *et al.* 2013).

Singh *et al.* font l'hypothèse du rôle de la diminution de LRP1 vasculaire dans l'accumulation d'A $\beta$  conduisant à une altération de son passage à travers la barrière hémato-encéphalique ; cette hypothèse n'est pas nouvelle et avait été envisagée par des travaux publiés en 2004 (Deane *et al.* 2004).

Les travaux de Singh *et al.* s'intéressent à la protéine  $\beta$ -amyloïde (A $\beta$ ) et à son implication dans la physiopathologie moléculaire de la maladie d'Alzheimer. Cependant, cette dernière est une maladie complexe et encore mal comprise. L'hypothèse dite de la « cascade amyloïde » postule que l'accumulation d'A $\beta$  dans le cerveau, résultant d'un clivage anormal de l'APP, est un événement essentiel et initiateur de la maladie d'Alzheimer. L'accumulation d'A $\beta$  dans le tissu cérébral est un événement important. Toutefois, les lésions caractéristiques de la maladie d'Alzheimer sont constituées non seulement de dépôts amyloïdes, mais également de dégénérescences neurofibrillaires impliquant la protéine tau. L'article n'étudie pas la protéine tau et ne s'intéresse qu'à un volet de la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer.

Devant cette complexité, la physiopathologie moléculaire peut être étudiée chez des modèles d'animaux conventionnels ou transgéniques qui expriment une ou plusieurs des protéines humaines impliquées dans cette maladie.

Les souris transgéniques permettent de modéliser certaines caractéristiques moléculaires de la maladie, cependant l'interprétation des résultats doit être confrontée aux particularités des différents modèles. Les auteurs eux-mêmes indiquent les limites possibles des modèles transgéniques. En effet, le modèle utilisé pour leurs travaux surexprime la protéine humaine A $\beta$ , qui se lie au cuivre. Dans ces conditions, l'homéostasie du cuivre peut être intrinsèquement perturbée se traduisant par une déficience en cuivre dans de tels modèles (Bayer *et al.* 2003; Maynard *et al.* 2002).

L'effet de l'exposition alimentaire au cuivre doit être également examiné au regard d'autres études démontrant un lien entre la maladie d'Alzheimer et l'exposition à d'autres métaux, d'une part et des interactions avec les concentrations en cholestérol, d'autre part.

Ainsi, dans une étude utilisant une lignée transgénique exprimant aussi la forme mutée du précurseur A $\beta$  (Railey *et al.* 2011), l'apport de zinc ou de fer (10 mg/L) dans l'eau de boisson altère la mémoire spatiale et l'apprentissage. Dans ces travaux, les effets du zinc semblent dus à une réduction du niveau de cuivre et donc à un déséquilibre dans les concentrations de ces deux métaux plutôt qu'à un effet direct du zinc. Par ailleurs, un déficit de mémoire lié à une exposition au zinc avait déjà été décrit chez le rat (Flinn *et al.* 2005).

D'autres observations confirment l'installation d'un déséquilibre progressif des métaux (Fe, Cu, Zn, Al) lors des processus de neuro-dégénérescence en lien avec le déclin des fonctions cognitives (Chacon *et al.* 2003; Gonzalez-Dominguez *et al.* 2014; White *et al.* 2004). Chez la souris, des effets sur l'état de stress oxydatif et pro-inflammatoire dans le cerveau, ainsi que l'augmentation d'A $\beta$ , sont associés à un déficit de mémoire et d'apprentissage spatial, observés uniquement lors d'apport conjoint de cholestérol et de cuivre.

Concernant les interactions avec le cholestérol, des travaux ont documenté une accumulation d'A $\beta$  après addition de traces de cuivre dans l'eau de boisson (0,12 ppm) chez le lapin, qui développe rapidement des plaques de type sénile sous un régime enrichi en cholestérol (Sparks and Schreurs 2003; Sparks *et al.* 2011). Les effets synergiques d'un apport alimentaire conjoint de cuivre et de cholestérol ont également été montrés chez le rat (Arnal *et al.* 2013) et chez la souris (Lu *et al.* 2009).

Au final, l'étude de Singh *et al.* cible un mécanisme moléculaire susceptible de contribuer à la physiopathogénie de la maladie d'Alzheimer et les auteurs restent prudents sur l'interprétation qu'il convient de donner à leurs observations.

De nombreux résultats suggèrent une relation entre le cuivre et la maladie d'Alzheimer, mais leur interprétation n'est pas nécessairement univoque, en raison d'une part, de la complexité intrinsèque des mécanismes physiopathologiques encore mal connus de la maladie d'Alzheimer et d'autre part, de la diversité des modèles expérimentaux, dont la pertinence individuelle rend l'interprétation des résultats délicate.

Cependant, des travaux réalisés dans différents modèles conventionnels, dans différentes espèces, convergent vers la conclusion d'un effet d'une surexposition au cuivre au regard des modifications de la régulation de la protéine  $\beta$ -amyloïde, observées dans la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer. Cette relation paraît aussi mettre en jeu des interactions importantes avec d'autres facteurs d'exposition également potentiellement impliqués, en particulier avec d'autres métaux ou/et avec le cholestérol.

#### **Comparaison entre les niveaux de cuivre utilisés dans l'étude et ceux utilisés dans le cadre des études de toxicité incluses dans le dossier des substances actives.**

L'étude de Singh *et al.* vise à explorer les mécanismes moléculaires de très faibles doses de cuivre sur la physio-pathogénie de la maladie d'Alzheimer alors que les études incluses dans les dossiers d'autorisation de mise sur le marché (AMM) mettent en œuvre des doses beaucoup plus élevées destinées à identifier les effets toxiques potentiels du cuivre sur l'ensemble des organes ou tissus dans le cadre de l'identification des dangers. Les "effets observés" dans les deux cas ne sont donc pas directement comparables.

Les études à court et à long terme présentées dans la monographie permettent à l'évaluateur du risque de fixer des doses journalières acceptables chez l'homme issues des études pour lesquelles aucun effet toxique n'a été observé chez l'animal. Le passage d'une espèce à l'autre nécessite l'utilisation de facteurs de conversion. Les doses sans effet néfaste pour la santé issues d'études au laboratoire qui ont été validées au niveau européen dans le cadre de la monographie sont résumées dans le tableau 1 (annexe I, EFSA 2008).

**Tableau 1** : NOAEL<sup>3</sup> déduites des études expérimentales chez l'animal pour la substance active « composés du cuivre ».

Toxicité court terme (90 jours)	NOAEL <sup>3</sup> (oral)
90 jours Rat	16 mg Cu/kg p.c. <sup>4</sup> /jour
90 jours Souris	97 mg Cu/kg p.c./jour
1 an Chien	15 mg Cu/kg p.c./jour
Toxicité long terme (2 ans)	
2 ans Rat	27 mg Cu/kg p.c./jour

Pour juxtaposer les expositions de l'étude de Singh *et al.* (exprimées en concentration dans l'eau de boisson) avec celles, des études à court et long terme du dossier "composés du cuivre" (exprimées en dose corporelle quotidienne), les concentrations de l'étude ont été converties en doses corporelles quotidiennes en utilisant les facteurs moyens par défaut proposés par l'EFSA ou la FDA pour les différents vecteurs de contamination (régime, eau), les espèces et la durée des études de toxicité. Les résultats sont présentés dans le tableau 2.

<sup>3</sup> NOAEL : No observed adverse effect level (dose sans effet néfaste)

<sup>4</sup> p.c.: poids corporel

**Tableau 2** : conversion de la teneur en cuivre dans l'eau de boisson (mg/L) en dose quotidienne (mg/kg p.c./j) chez la souris.

Teneur CuSO <sub>4</sub> = 0,13 mg/L (eau de boisson)	Etudes sub-chroniques	
	EFSA	FDA
FC*	0,15 <sup>b</sup>	0,265 <sup>b</sup>
Dose (mg CuSO <sub>4</sub> /kg p.c. /j)	0,0195	0,0344
Dose (mg Cu /kg p.c. /j)**	0,0050	0,0088
* * facteur de conversion moyen pour les 2 sexes confondus		
** pour une teneur en cuivre du CuSO <sub>4</sub> de 25,4%		

La concentration de 0,13 mg/L du CuSO<sub>4</sub> dans l'eau de boisson administrée aux souris pendant 90 jours, bien qu'elle soit 52 fois plus élevée que la valeur normale (Singh *et al.*, 2013), représente une dose de cuivre comprise entre 0,005 et 0,0088 mg/kg/jour.

Bien que les "effets" ne soient pas directement comparables (mécanisme d'action versus effet néfaste), ces calculs montrent à l'évidence que l'étude de Singh *et al.* porte sur un niveau d'exposition largement inférieur (de l'ordre de 1000 fois) à ceux examinés dans le dossier réglementaire européen (tableau 2). Ces résultats doivent être examinés au regard des différences de sensibilité et de régulation du cuivre selon les espèces.

**Comparaison entre le niveau de cuivre utilisé dans l'étude et les niveaux d'exposition estimés pour les opérateurs, les travailleurs agricoles, les résidents et les consommateurs.**

La comparaison des doses d'exposition estimées chez l'homme, que ce soit en tant que travailleur ou de consommateur, avec les doses mises en œuvre dans la publication implique l'utilisation de facteurs de conversion théoriques qui diffèrent selon les modèles. De plus, cette comparaison n'est pertinente que si l'on admet 1/que les effets de la substance testée sont identiques chez l'homme et l'animal (ici la souris), 2/ que les doses d'effet sont similaires en conditions d'excès et en conditions de carence et 3/ que le cuivre est régulé dans l'organisme de façon similaire dans toutes les espèces. Or, il est décrit dans la littérature que les effets sont différents d'une espèce à l'autre pour de nombreuses substances.

- 1- Conversion des doses de l'étude pour les souris en dose journalière pour l'homme.

Les données de l'étude de Singh *et al.* ont été converties, à partir du tableau en équivalent de doses humaines quotidiennes au moyen des facteurs de conversion recommandés par l'EFSA ou la FDA (tableau 3).

<sup>5</sup> Guidance on selected default values to be used by the EFSA Scientific Committee, Scientific Panels and Units in the absence of actual measured data, EFSA Journal 2012;10(3):2579

<sup>6</sup> Guidance for Industry Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, 2005

**Tableau 3** : conversion des teneurs en cuivre dans l'eau de boisson (mg/L) en dose quotidienne (mg/kg p.c./j) pour l'homme.

CuSO <sub>4</sub> = 0,13 mg/L (eau de boisson)				
	Etudes sub-chroniques		Equivalent de dose humaine***	
	EFSA	FDA	EFSA	FDA
FC*	0,15	0,265	(Poids A / Poids H) <sup>1/4</sup>	
Dose (mg <b>CuSO<sub>4</sub></b> /kg p.c. /j)	0,0195	0,0344	0,0028	0,0049
Dose (mg <b>Cu</b> /kg p.c. /j)**	0,0050	0,0088	<b>0,0007</b>	<b>0,0012</b>
Dose (mg <b>Cu</b> /jour)			<b>0.049</b>	<b>0.084</b>

\* facteur de conversion moyen pour les 2 sexes confondus  
 \*\* pour une teneur en cuivre de 25,4% du CuSO<sub>4</sub>  
 \*\*\* Dose H /Dose A = (Poids A/Poids H) x (Poids H / Poids A)<sup>3/4</sup> = (Poids H/Poids A)<sup>-1</sup> x (Poids H / Poids A)<sup>3/4</sup> = (Poids A / Poids H)<sup>1/4</sup>

## 2- Les opérateurs, travailleurs agricoles et résidents

Un premier élément de comparaison peut être établi en se référant aux avis de l'Anses de la période 2009 à 2011 relatifs aux préparations à base de cuivre actuellement autorisées en France et pour lesquelles une estimation de l'exposition de ces catégories de population a été conduite (tableau 4). Ces avis mentionnent le pourcentage du niveau d'exposition au cuivre acceptable pour l'opérateur ou "AOEL" fixé à 0,072 mg/kg pc/j lors de son inscription à l'annexe I de la directive 91/414/CEE (EFSA 2008). Les valeurs d'exposition estimées les plus élevées (exprimées en % de l'AOEL) résultant des évaluations de l'Agence de l'ensemble des préparations à base de cuivre ou de ses composés, ont été exprimées en doses corporelles et sont présentées dans le tableau 4. Ainsi la comparaison directe des niveaux d'exposition estimés des opérateurs, des travailleurs et des résidents avec les équivalents de dose extrapolés à partir de la publication de Singh *et al.* est présentée dans le tableau 4 sous forme de ratio. L'exposition *via* les usages réglementés autres que phytopharmaceutiques n'est pas intégrée dans cette estimation.

**Tableau 4** : Comparaison des doses d'exposition estimées des opérateurs, des travailleurs et des résidents avec les doses de l'étude.

	Opérateurs	Travailleurs	Résidents
	Max	Max	Max
% AOEL	95%*	83%	55%
Usages	Pêcher, Prunier, olivier, noisetier, cerisier, abricotier	Vigne	Pêcher, Prunier, olivier, noisetier, cerisier, abricotier
Dose mg/kg	0,0684	0,0598	0,039
<b>Ratio dose d'exposition / dose équivalente humaine de l'étude (cf tableau 3)</b>			
EFSA	98	85	56
FDA	57	50	32,5

\*valeurs obtenues sans port d'EPI

Les doses utilisées dans l'étude de Singh *et al.* étant très faibles (équivalent de dose humaine estimé à 0,0007-0,0012 mg/kg pc /j., cf tableau 3), les calculs confirment l'écart important entre les expositions estimées pour ces diverses catégories de population et celles de l'étude. Par ailleurs, il est à noter que les doses humaines calculées à partir de l'étude apparaissent très inférieures aux doses sans effet néfaste établies par les études de toxicité du dossier réglementaire européen.

### 3- Les consommateurs

Considérant le niveau de base de cuivre médian dans les aliments et en utilisant le modèle PRIMo<sup>7</sup>, le niveau d'exposition estimé correspondant au groupe de population la plus exposée atteint 56,4% de la dose journalière admissible (DJA<sup>8</sup>) (0,085 mg de cuivre/kg p.c./j). Ce niveau de base médian prend en compte la dispersion de la contamination en cuivre pour chaque denrée (cuivre ubiquitaire ; usages produits phytopharmaceutiques ; usage matière fertilisante ; usage additif alimentaire pour animaux d'élevage ; usage médicament vétérinaire...).

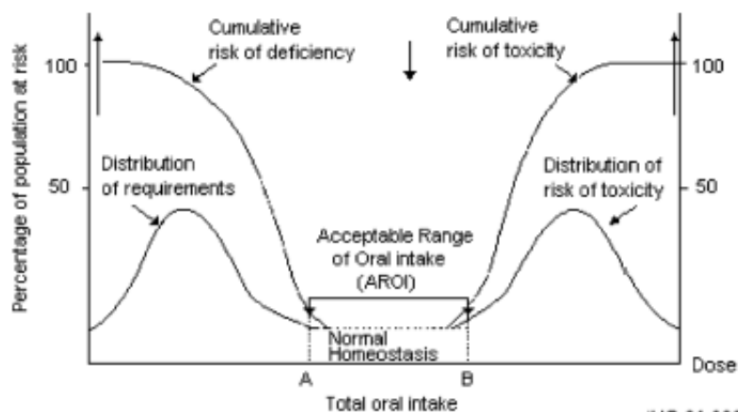
Considérant les usages et les doses autorisées actuellement de produits phytopharmaceutiques à base de cuivre, les niveaux de base de cuivre médian dans les aliments ont été remplacés par les valeurs médianes en cuivre (STMR) pour les végétaux ainsi traités. Ce scénario affiné considère qu'une culture qui peut faire l'objet d'un traitement phytopharmaceutique avec une préparation à base de cuivre est systématiquement traitée (scénario d'exposition « pire cas »). Ainsi, le niveau d'exposition correspondant au groupe de population la plus exposée atteint 77,2% de la DJA (ce qui correspond à 0,115 mg/kg p.c./j).

Concernant l'apport par l'eau du robinet, en considérant la concentration médiane de cuivre dans l'eau du robinet en France de 0,028 mg Cu/L (base de données SISE-eaux) et les quantités d'eau consommées en Europe évaluées par l'EFSA, l'eau constitue un contributeur faible. L'exposition résultant de la consommation de l'eau est inférieure à 1% de la DJA soit à 0,0015 mg/kg p.c./j. En revanche, si l'on considère la valeur réglementaire du cuivre dans l'eau qui est à 2 mg Cu/L (EU Directive 98/83<sup>9</sup>), l'apport de cuivre *via* la consommation de l'eau peut atteindre 0,1 mg/kg p.c./j.

En conclusion, le niveau d'exposition de l'étude (équivalent de dose humaine estimée) est inférieur aux niveaux d'exposition estimés pour les opérateurs, les travailleurs et les résidents ainsi que pour les consommateurs dans le cadre des usages des produits phytopharmaceutiques.

#### **Comparaison avec les bornes de l'homéostasie du Cuivre**

Il est bien établi que le cuivre est un oligo-élément essentiel pour les organismes vivants, nécessaire au fonctionnement de multiples fonctions physiologiques et faisant l'objet d'une régulation homéostatique qui permet le maintien des concentrations biologiques dans une étroite gamme de valeurs. De part et d'autre de celle-ci, des effets délétères sont induits par la carence ou l'excès de cuivre (cf. figure 1).



**Figure 1:** Représentation théorique des niveaux acceptables d'incorporation orale de Cuivre chez l'Homme (IPCS 2002).

<sup>7</sup> EFSA (European Food Safety Authority), 2007. Reasoned opinion on the potential chronic and acute risk to consumers' health arising from proposed temporary EU MRLs according to Regulation (EC) No 396/2005 on Maximum Residue Levels of Pesticides in Food and Feed of Plant and Animal Origin. 15 March 2007.

<sup>8</sup> DJA du cuivre = 0,15 mg/kg p.c./j (SANCO/150/08)

<sup>9</sup> European Commission (1998); Council Directive 1998/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption. Official Journal of the European Communities, 05.12.1998, L 330/32.

Les bornes inférieure et supérieure de la fourchette acceptable de l'apport oral de cuivre ("AROI" pour Acceptable Range of Oral Intake") ont été récemment discutées (Chambers *et al.* 2010). Les auteurs de cette publication ont développé un modèle d'analyse de régression théorique permettant d'exploiter une importante base actualisée de données sur le cuivre et de construire des relations dose réponse pour les états de carence et de surcharge en cuivre.

Cette modélisation conduit à recommander un apport optimal de 2,6 mg de Cu/j pour l'homme soit une valeur supérieure au RDI (Recommended Dietary Intake)<sup>10</sup> fixé à 0,9 mg/j selon US Food and Nutrition Board (Food and Nutrition Board 2001).

La borne supérieure de la gamme, fixée par l'US Food and Nutrition Board à 10 mg Cu /j sur la base de l'absence de modification de la fonction hépatique chez l'adulte, a aussi fait l'objet de discussions. S'ils ne proposent pas de nouvelle valeur pour cette borne, les auteurs soulignent le manque de données humaines sur des durées supérieures à 100 jours et la difficulté d'évaluer l'impact des expositions chroniques. Sur la base d'autres travaux (O'Connor *et al.* 2003; Turnlund 1991), le comité européen SCF<sup>11</sup> a fixé la borne supérieure (upper intake level) à 5 mg/jour (SCF 2003), en considérant un facteur 2 pour prendre en compte la variabilité individuelle au sein de la population normale.

En utilisant ces facteurs de correction, la dose quotidienne ingérée par les souris dans l'étude de Singh *et al.* pourrait se traduire par une dose quotidienne équivalente pour l'homme (70 kg) de 0,05 à 0,084 mg/j soit une valeur de l'ordre du 1/10ème du RDI proposée par l'US Food Nutrition Board ou de 100 fois inférieure à la borne supérieure de la gamme de valeur acceptable de consommation par jour chez l'homme.

La valeur des bornes inférieures et supérieures d'ingestion orales sont très variables selon des espèces : par exemple, elles sont basses pour le mouton qui est très sensible au cuivre et élevées pour le porc qui est facilement carencé. La connaissance des bornes pour la souris serait utile pour interpréter les résultats.

#### 4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

Les travaux de Singh *et al.* 2013 représentent des études mécanistiques fondamentales qui décrivent des modifications de la régulation de la protéine A $\beta$  dans le cerveau sous l'effet d'une exposition alimentaire au cuivre. Ces modifications ont été souvent observées dans le cerveau, depuis plusieurs années dans des études portant sur plusieurs espèces animales.

L'interprétation de ces observations et de la relation avec le cuivre est à replacer dans le contexte des connaissances encore insuffisantes sur la physio-pathogénie de la maladie d'Alzheimer qui met en jeu des mécanismes multiples et complexes, impliquant notamment les métaux de transition tels que le cuivre, le fer et le zinc et des lipides, en particulier, le cholestérol.

Par ailleurs, le cuivre est un oligo-élément essentiel pour les organismes vivants. A ce titre, il fait l'objet d'une régulation homéostatique qui maintient dans l'organisme des concentrations biologiques dans une étroite fourchette de valeurs.

La comparaison entre les niveaux de cuivre utilisés dans l'étude et ceux utilisés dans le cadre des études de toxicité incluses dans le dossier des substances actives fait apparaître des différences très importantes, qui peuvent être expliquées par les objectifs distincts des deux types d'investigations. En effet, l'étude de Singh *et al.* met en œuvre de très faibles doses d'exposition administrées *via* l'eau de boisson pour conforter une hypothèse de mécanisme moléculaire pouvant expliquer dans un modèle particulier les effets du cuivre dans la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer. En revanche, les études de toxicité du dossier d'évaluation de la substance

<sup>10</sup> apport nutritionnel de référence

<sup>11</sup> Scientific Committee on Food, European Commission.



active ont pour objet d'identifier la nature et l'importance des effets (organes cibles, pathologies induites...) et de fixer une dose pour laquelle aucun effet néfaste n'est observé.

Des calculs fondés sur des facteurs de conversion moyens proposés par l'EFSA ou la FDA montrent que l'étude de Singh *et al.* porte sur un niveau d'exposition en cuivre très largement inférieur à ceux examinés dans le dossier européen des substances actives « composés du cuivre ».

La transposition de la dose mise en œuvre dans la publication en dose journalière humaine et la comparaison avec les doses d'exposition estimées chez l'homme (travailleurs, opérateurs, résidents, consommateurs) présentent des difficultés en raison de la sensibilité et des mécanismes de régulation (homéostasie) qui peuvent être différents entre les espèces.

Toutefois, une première comparaison a été conduite en utilisant les évaluations de risques déjà réalisées lors des demandes d'AMM de préparations phytopharmaceutiques à base de cuivre et de ses composés. Les résultats montrent des écarts importants entre la dose utilisée dans l'étude et les doses d'exposition qui ont été considérées comme acceptables au sens du règlement (CE) N°1107/2009, lors de l'évaluation du risque.

Par ailleurs, selon la même méthode de comparaison, le niveau d'exposition de l'étude de Singh *et al.* est également très inférieur à l'apport nutritionnel de référence en cuivre recommandé par le US Food and Nutrition Board et à la borne haute de l'homéostasie du cuivre pour l'homme fixée par le comité européen.

En l'absence de données sur l'homéostasie du cuivre chez la souris et d'information sur le niveau de la dose administrée dans l'étude de Singh *et al.* sur la courbe de régulation homéostatique, les résultats de cette étude sont difficilement interprétables au regard des effets observés dans des études de toxicité réalisées avec des doses très supérieures.

**Marc MORTUREUX**

#### **MOTS-CLES**

Composés du Cuivre, toxicité, maladie d'Alzheimer, exposition opérateur, exposition travailleur, exposition résident et exposition consommateur.

**BIBLIOGRAPHIE**

Arnal N, Castillo O, de Alaniz MJ, Marra CA (2013) Effects of Copper and/or Cholesterol Overload on Mitochondrial Function in a Rat Model of Incipient Neurodegeneration. *Int J Alzheimers Dis* **2013**, 645379.

Bayer TA, Schafer S, *et al.* (2003) Dietary Cu stabilizes brain superoxide dismutase 1 activity and reduces amyloid Abeta production in APP23 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(24), 14187-92.

Chacon MA, Barria MI, Lorca R, Huidobro-Toro JP, Inestrosa NC (2003) A human prion protein peptide (PrP(59-91)) protects against copper neurotoxicity. *Mol Psychiatry* **8**(10), 853-62, 835.

Chambers A, Krewski D, Birkett N, Plunkett L, Hertzberg R, Danzeisen R, Aggett PJ, Starr TB, Baker S, Dourson M, Jones P, Keen CL, Meek B, Schoeny R, Slob W (2010) An exposure-response curve for copper excess and deficiency. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* **13**(7-8), 546-78.

Deane R, Wu Z, Sagare A, Davis J, Du Yan S, Hamm K, Xu F, Parisi M, LaRue B, Hu HW, Spijkers P, Guo H, Song X, Lenting PJ, Van Nostrand WE, Zlokovic BV (2004) LRP/amyloid beta-peptide interaction mediates differential brain efflux of Abeta isoforms. *Neuron* **43**(3), 333-44.

EFSA (2008) Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance copper (I), copper (II) variants namely copper hydroxide, copper oxychloride, tribasic copper sulfate, copper (I) oxide, Bordeaux mixture. *EFSA Scientific Report (2008)* **187**, 1-101. <http://www.efsa.europa.eu/fr/efsajournal/doc/187r.pdf>

EFSA (2013) Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of confirmatory data submitted for the active substance Copper (I), copper (II) variants namely copper hydroxide, copper oxychloride, tribasic copper tribasic copper sulfate, copper (I) oxide, Bordeaux mixture. *EFSA Journal* **11**(6), 3235. <http://www.efsa.europa.eu/fr/efsajournal/doc/3235.pdf>

Flinn JM, Hunter D, Linkous DH, Lanzirotti A, Smith LN, Brightwell J, Jones BF (2005) Enhanced zinc consumption causes memory deficits and increased brain levels of zinc. *Physiol Behav* **83**(5), 793-803.

Food and Nutrition Board (2001) Dietary reference intakes: vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium and zinc. *Institute of medicine*. Washington D.C., National Academy Press.

Gonzalez-Dominguez R, Garcia-Barrera T, Gomez-Ariza JL (2014) Characterization of metal profiles in serum during the progression of Alzheimer's disease. *Metallomics* **6**(2), 292-300.

Hung YH, Bush AI, La Fontaine S (2013) Links between copper and cholesterol in Alzheimer's disease. *Front Physiol* **4**, 111.

IPCS (2002) Principles and methods for the assessment of risks from trace elements. *Geneva: World Health Organization International Programme on Chemical safety*.

Jellinger KA (2013) The relevance of metals in the pathophysiology of neurodegeneration, pathological considerations. *Int Rev Neurobiol* **110**, 1-47.

Lu J, Wu DM, Zheng YL, Sun DX, Hu B, Shan Q, Zhang ZF, Fan SH (2009) Trace amounts of copper exacerbate beta amyloid-induced neurotoxicity in the cholesterol-fed mice through TNF-mediated inflammatory pathway. *Brain Behav Immun* **23**(2), 193-203.

Maynard CJ, Cappai R, Volitakis I, Cherny RA, White AR, Beyreuther K, Masters CL, Bush AI, Li QX (2002) Overexpression of Alzheimer's disease amyloid-beta opposes the age-dependent elevations of brain copper and iron. *J Biol Chem* **277**(47), 44670-6.

Morris MC, Evans DA, Tangney CC, Bienias JL, Schneider JA, Wilson RS, Scherr PA (2006) Dietary copper and high saturated and trans fat intakes associated with cognitive decline. *Arch Neurol* **63**(8), 1085-8.

O'Connor JM, Bonham MP, Turley E, McKeown A, McKelvey-Martin VJ, Gilmore WS, Strain JJ (2003) Copper supplementation has no effect on markers of DNA damage and liver function in healthy adults (FOODCUE project). *Ann Nutr Metab* **47**(5), 201-6.

Railey AM, Groeber CM, Flinn JM (2011) The effect of metals on spatial memory in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **24**(2), 375-81.

SCF (2003) Opinion of the Scientific Committee on Food on the intolerable upper intake level of copper. *SCF/CS/NUT/UPPLEV/57 Final*.  
[http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out176\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out176_en.pdf)

Singh I, Sagare AP, Coma M, Perlmutter D, Gelein R, Bell RD, Deane RJ, Zhong E, Parisi M, Ciszewski J, Kasper RT, Deane R (2013) Low levels of copper disrupt brain amyloid-beta homeostasis by altering its production and clearance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(36), 14771-6.

Sparks DL, Schreurs BG (2003) Trace amounts of copper in water induce beta-amyloid plaques and learning deficits in a rabbit model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(19), 11065-9.

Sparks DL, Ziolkowski C, Lawmaster T, Martin T (2011) Influence of water quality on cholesterol-induced tau pathology: preliminary data. *Int J Alzheimers Dis* **2011**, 987023. Available at

Squitti R, Bressi F, Pasqualetti P, Bonomini C, Ghidoni R, Binetti G, Cassetta E, Moffa F, Ventriglia M, Vernieri F, Rossini PM (2009) Longitudinal prognostic value of serum "free" copper in patients with Alzheimer disease. *Neurology* **72**(1), 50-5.

Squitti R, Polimanti R (2013) Copper phenotype in Alzheimer's disease: dissecting the pathway. *Am J Neurodegener Dis* **2**(2), 46-56.

Turnlund JR (1991) Bioavailability of dietary minerals to humans: the stable isotope approach. *Crit Rev Food Sci Nutr* **30**(4), 387-96.

White AR, Barnham KJ, Huang X, Voltakis I, Beyreuther K, Masters CL, Cherny RA, Bush AI, Cappai R (2004) Iron inhibits neurotoxicity induced by trace copper and biological reductants. *J Biol Inorg Chem* **9**(3), 269-80.