

Effets toxiques des substances en mélange lors d'expositions en environnement général et professionnel

Évaluation de la toxicité des mélanges en utilisant des nouveaux modèles expérimentaux

Période : avril 2009 à août 2009

Kannan KRISHNAN et Michelle GAGNÉ

Université de Montréal – Département de santé environnementale et de santé au travail – Montréal – Canada

Mots clés : Additivité, Infra-additivité, Interactions, Mélange, Risque cumulatif, Supra-additivité

Les modèles animaux et les modèles *in vitro* jouent un rôle important dans l'évaluation de la toxicité de mélanges complexes. L'évolution de ces modèles contribue à réduire l'incertitude en analyse de risque relative aux mélanges de substances chimiques, tant pour les travailleurs que pour la population générale. En fait, de nouveaux modèles expérimentaux visent à améliorer des évaluations toxicologiques à faibles doses ainsi qu'une meilleure caractérisation du rôle des facteurs de susceptibilité individuelle. Cette NAS présente deux études portant sur l'évaluation de la toxicité de mélanges en utilisant des modèles expérimentaux, l'un *in vitro* et l'autre *in vivo*.

Le modèle *in vitro* décrit dans la publication de Ghisari et Bonefeld-Jorgensen (2009) permet d'évaluer la toxicité d'un mélange à plusieurs concentrations de composantes (incluant la concentration sans effet observé) et ainsi, détermine la gamme de concentrations des composants du mélange respectant l'additivité⁽¹⁾. Le modèle *in vivo* présenté dans l'article de Jansen *et al.* (2009) permet de relever l'effet du polymorphisme sur la toxicité d'un mélange de pesticides. Ce dernier aspect est important surtout dans le contexte de la variabilité au sein de la population quant à la susceptibilité des individus aux effets des substances en mélange.

Évaluation *in vitro* des effets de plastifiants en mélange : fonctions des récepteurs à œstrogène et des hormones thyroïdiennes

Analyse

Ghisari et Bonefeld-Jorgensen (2009) ont investigué l'activité œstrogénique et thyroïdienne de certains plastifiants⁽²⁾ et des composants phénoliques⁽³⁾ ayant la propriété d'augmenter la flexibilité des matériaux. Ils peuvent aussi se retrouver dans certaines peintures ou adhésifs. La présence ubiquiste de ces produits (équipements médicaux, emballages alimentaires, jouets pour enfants) augmente la possibilité de coexposition (i.e. exposition simultanée ou séquentielle avec d'autres produits) et suscite l'intérêt d'étudier leurs effets en mélange. Plus précisément, Ghisari et Bonefeld-Jorgensen (2009) se sont intéressés aux impacts sur le système reproducteur et endocrinien des substances suivantes: le butyl-benzylphthalate (BBP), le bisphénol A (BPA), le 4-n-nonylphénol (NP), le 4-tert-octylphénol (tOP), le 4-chloro-3-méthylphénol (CMP), et le résorcinol (RES). Pour chacune de ces substances, l'effet antagoniste sur le système hormonal thyroïdien a été évalué grâce à la mesure de la prolifération cellulaire de la lignée tumorale GH₃ d'hypophyse de rat. L'activité œstrogénique des substances individuelles a été étudiée selon leur affinité pour le récepteur à œstrogène de cellules MVLN⁽⁴⁾ et leur capacité

à induire une réponse. Afin de caractériser les effets combinés de ces substances, les cellules ont été parallèlement exposées aux substances seules ou en mélange (à leurs NOEC⁽⁵⁾, LOEC⁽⁶⁾ et EC₅₀⁽⁷⁾ respectives). L'hypothèse de départ de ces auteurs était que ces six composés agissaient sur les mêmes cibles (les récepteurs) et que l'additivité des concentrations était susceptible de prédire l'effet des mélanges sur les cellules GH₃ et MVLN. Les résultats expérimentaux ont donc été comparés aux prédictions obtenues selon la courbe dose-réponse des substances individuelles et leur ratio au sein du mélange (selon le principe d'additivité). Les résultats indiquent que les mélanges de BBP, BPA, NP, tOP, CMP et de RES induisent une réponse additive au niveau des cellules MVLN en absence et en présence d'œstrogène. En effet, les niveaux d'activité prédits des récepteurs-œstrogènes étaient équivalents à ceux mesurés expérimentalement, pour les mélanges NOEC et LOEC, respectivement. Au contraire, les effets thyroïdiens des mélanges étaient inférieurs à ceux attendus par les prédictions, tant en absence qu'en présence d'hormone thyroïdienne (T₃). La prolifération observée des cellules était plus grande que les valeurs prédites, pour les mélanges NOEC, LOEC et EC₅₀, respectivement.

Commentaire

L'évaluation de la toxicité *in vitro* du butyl-benzylphthalate (BBP), du bisphénol A (BPA), du 4-n-nonylphénol (NP), du 4-tert-

octylphénol (tOP), du 4-chloro-3-méthylphénol (CMP) et du résorcinol (RES) effectuée par **Ghisari et Bonfeld-Jorgensen (2009)** indique que le mélange produit un effet infra-additif sur le système hormonal thyroïdien, effet qui serait dû à une interférence au niveau des enzymes du métabolisme (par exemple: cytochrome P450). Cette interaction modifierait la croissance des cellules GH₃, un phénomène qui a déjà été observé dans des études antérieures (Rajapakse *et al.*, 2004). Cependant, une réponse additive au niveau des cellules MVLN en absence et en présence d'œstrogène a été observée.

L'effet infra-additif⁸ rapporté dans cette étude serait dû à une interférence au niveau des enzymes du métabolisme (par exemple: cytochrome P450) qui modifierait la croissance des cellules GH₃, phénomène déjà observé dans des études antérieures (Rajapakse *et al.*, 2004). Cependant, la correspondance *in vitro* - *in vivo* des résultats de **Ghisari et Bonfeld-Jorgensen (2009)** n'est pas connue. Cette extrapolation est cruciale, puisqu'elle permet de mieux comprendre les risques pour la population exposée. Dans ce contexte, les résultats pourraient être interprétés avec des modèles pharmacocinétiques prenant en compte des phénomènes et des interactions dans l'organisme entier.

Évaluation *in vivo* de la toxicité d'un mélange d'organophosphorés : rôle du polymorphisme de l'enzyme paraoxonase 1

Analyse

Jansen *et al.* (2009) ont étudié l'effet de la paraoxonase-1 (PON1) sur la toxicité d'un mélange d'organophosphorés (OP). La PON1 est une estérase qui hydrolyse de nombreux substrats dont les OP (Costa *et al.*, 2003). Dans la population humaine, la PON1 est caractérisée par un polymorphisme génétique⁹, notamment lié à la substitution d'acides aminés en position 192, soit l'arginine (PON1_{R192}) ou la glutamine (PON1_{Q192}). Comme il n'est pas possible d'étudier les effets de ce polymorphisme chez les humains, l'utilisation de souris transgéniques constitue une alternative intéressante en tant que modèle expérimental *in vivo* (Costa *et al.*, 2003). **Jansen *et al.* (2009)** ont donc vérifié l'impact du polymorphisme sur la toxicité d'organophosphorés en mélange. Plus précisément, ils ont utilisé quatre types de souris : des souris n'exprimant pas le gène PON1 ou *knockout* (PON1^{-/-}), des souris possédant le gène normal ou sauvage (PON1^{+/+}) et deux souches de souris transgéniques exprimant deux formes alléliques humaines différentes (hPON1_{Q192} et hPON1_{R192}). Les organophosphorés utilisés dans ce cadre expérimental étaient le chlorpyrifos oxon (CPO), le diazoxon (DZO), le paraoxon (PO) et le malaaxon (MO). Des études ont déjà démontré que l'exposition au MO, un substrat de la carboxylestérase (CaE), combiné à des composés qui inhibent la CaE (comme le CPO, le DZO et le PO), conduit à une potentialisation du MO, qui lui, inhibe une enzyme essentielle du système nerveux, l'acétylcholinestérase (AChE). Les auteurs ont tout d'abord évalué le niveau de PON1 plasmatique de chacune des souches de souris : les hPON1_{Q192} avaient le plus haut niveau, soit 50 % de plus que les souris hPON1_{R192} et 20 % de

plus que les PON1^{+/+}. De leur côté, les souris *knockout* avaient un niveau nul de cette enzyme. Ensuite, les souris ont été exposées, par la voie cutanée, aux composés (CPO, DZO, PO et MO), seuls ou de façon séquentielle. Pour ce dernier scénario, les souris étaient tout d'abord exposées à un premier composé (CPO: 0,75 mg/kg; DZO: 0,5 mg/kg ou PO: 0,35 mg/kg), puis 4 heures plus tard, étaient exposées au MO (0, 30, 60 et 100 mg/kg). L'activité de l'AChE était mesurée dans divers tissus (diaphragme et cerveau), puis exprimée en pourcentage (par rapport aux niveaux des contrôles non exposés) afin de déterminer la toxicité des mélanges.

L'hypothèse initiale de **Jansen *et al.* (2009)** a été confirmée par les résultats de leurs expérimentations : la pré-exposition à des organophosphorés qui inactivent la CaE (CPO, DZO et PO) augmente la toxicité de ses substrats, tel le MO. Cette augmentation est toutefois modulée selon le statut génotypique de la PON1. Pour ce qui est des souris *knockout*, comme elles ne possèdent pas la PON1, la potentialisation de la toxicité du MO par le CPO et le DZO était significative lorsqu'elle était comparée à l'exposition seule. Chez les souris transgéniques exprimant les gènes humains, la potentialisation par le CPO était plus importante chez les hPON1_{Q192} que chez les hPON1_{R192}. Ceci serait dû à leur différente efficacité à détoxifier le CPO.

Dans le cas de MO, la potentialisation dépendait du polymorphisme de la PON1. Par contre, concernant le DZO, aucune différence n'a été notée au niveau de l'activité de l'AChE entre les hPON1_{Q192} et les hPON1_{R192}; ni au niveau du cerveau ni du diaphragme, puisque les deux formes de l'enzyme auraient la même capacité d'hydrolyse sur ce composé. Finalement, la potentialisation par PO était sensiblement la même pour les quatre génotypes étudiés. Les symptômes cholinergiques (par exemple : l'hypoactivité, les difficultés de thermorégulation, les tremblements, etc.) ont aussi été enregistrés chez les souris à 8 heures post-exposition. Bien qu'il soit plus difficile d'évaluer l'additivité sur ces observations, elles confirment l'influence des formes géniques de la PON1 sur la toxicité des OP. À des doses comparables de CPO et de DZO, lors des expositions séquentielles, les souris PON1^{+/+} et les hPON1_{R192} étaient plus résistantes que les PON1^{-/-} et les hPON1_{Q192} à développer de tels symptômes. De plus, tout comme pour les mesures de l'activité de l'AChE, aucune différence n'a été observée entre les génotypes en ce qui a trait à l'exposition au PO suivi du MO.

Commentaire

L'étude de **Jansen *et al.* (2009)** de l'impact du polymorphisme sur la toxicité d'organophosphorés en mélange, i.e. le chlorpyrifos oxon (CPO), le diazoxon (DZO), le paraoxon (PO) et le malaaxon (MO) indique qu'une pré-exposition à des organophosphorés qui inactivent la CaE (CPO, DZO et PO) augmente la toxicité de ses substrats tel le MO. Cette augmentation est toutefois modulée selon le statut génotypique de la PON1. Ces observations ont été obtenues pour l'exposition séquentielle transcutanée des OP, mais l'exposition simultanée à ces produits n'a pas été évaluée. De plus, l'applicabilité de ces résultats pour d'autres voies d'exposition plus pertinentes n'est pas connue.

Évaluation de la toxicité des mélanges en utilisant des nouveaux modèles expérimentaux

Kannan KRISHNAN et Michelle GAGNÉ

CONCLUSION GÉNÉRALE

L'étude de **Ghisari et Bonfeld-Jorgensen (2009)** s'intéresse à des hormones ayant un grand rôle à jouer dans le développement fœtal du cerveau et des organes reproducteurs. La plupart des études actuelles démontrent que les perturbateurs endocriniens seuls ne semblent pas suffisamment puissants pour induire des effets significatifs comparativement aux niveaux naturels des hormones humaines. Le fait que la population soit exposée à un grand nombre de ces substances en mélanges complexes, pourrait toutefois rendre possible que leurs actions soient combinées. Bien que les résultats de l'étude de **Ghisari et Bonfeld-Jorgensen (2009)** indiquent l'absence d'effet supra-additif par rapport à ces substances en mélange, la possibilité et les conséquences d'interactions pharmacocinétiques restent à évaluer.

Les résultats de l'étude de **Jansen et al. (2009)** démontrent que le polymorphisme du PON1 peut avoir des conséquences sur la susceptibilité d'individus exposés à des organophosphorés lors d'expositions séquentielles. En effet, les individus présentant la forme hPON1_{R192} seraient avantagés, puisque cette dernière est plus apte à détoxifier certains pesticides, ce qui minimiserait leurs effets sur le système nerveux central. De plus, le polymorphisme pourrait avoir un véritable impact sur la toxicité d'autres composés qui sont détoxifiés par les CaE, dont possiblement les pyrethroïdes et certains médicaments.

Mots clés utilisés pour la recherche bibliographique

Additivity, Antagonism, Cumulative risk, Interaction, Mixture, Occupational, Potentiation, Synergism, Worker.

Publications analysées

Jansen KL, Cole TB, Park SS et al. Paraoxonase 1 (PON1) modulates the toxicity of mixed organophosphorus compounds. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2009; 236(2):142-53.

Ghisari M, Bonfeld-Jorgensen EC. Effects of plasticizers and their mixtures on estrogen receptor and thyroid hormone functions. *Toxicol. Lett.* 2009; 189(1):67-77.

Publications de référence

Committee on the Health Risks of Phthalates. Phthalates and cumulative risk assessment: The task ahead. NRC (National Research Council). The National Academies Press. Washington, D.C. 2008; 208 pages.

http://www.nap.edu/catalog.php?record_id=12528.

Costa LG, Cole TB, Jarvik GP et al. Functional genomic of the paraoxonase (PON1) polymorphisms: effects on pesticide sensitivity, cardiovascular disease, and drug metabolism. *Annu. Rev. Med.* 2003; 54:371-92.

Rajakpase N, Silva E, Scholze M et al. Deviation from additivity with estrogenic mixtures containing 4-nonylphenol and 4-tert-octylphenol detected in the E-SCREEN assay. *Environ. Sci. Technol.* 2004; 38(23):6343-52.

Publications non sélectionnées

Bosgra S, Van Eijkeren JC, Van der Schans MJ et al. Toxicodynamic analysis of the combined cholinesterase inhibition by paraoxon and methamidophos in human whole blood. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2009; 236(1):9-15.

Cet article décrit un modèle toxicodynamique pour l'inhibition de la cholinestérase basé sur des données in vitro, mais l'applicabilité des résultats pour un organisme entier (in vivo) n'est pas démontrée.

Cemeli E, Mirkova E, Chiuchiarelli G et al. Investigation on the mechanisms of genotoxicity of butadiene, styrene and their combination in human lymphocytes using the Comet assay. *Mutat. Res.* 2009; 664(1-2):69-76.

Aucun modèle d'additivité n'a été utilisé pour analyser les résultats; les résultats in vitro ne permettent pas d'évaluer la toxicité des mélanges pour l'animal entier.

Chang TY, Wang VS, Hwang BF et al. Effects of co-exposure to noise and mixture of organic solvents on blood pressure. *J. Occup. Health.* 2009; 51(4):332-9.

Cet article décrit l'effet combiné des substances chimiques et du bruit. Il manque des données dose-réponse pour la caractérisation de l'additivité.

Hoyos-Giraldo LS, Carvajal S, Cajas-Salazar N et al. Chromosome aberrations in workers exposed to organic solvents: Influence of polymorphisms in xenobiotic-metabolism and DNA repair genes. *Mutat. Res.* 2009; 666(1-2):8-15.

Cet article rapporte une évaluation des aberrations microsomiales dans les lymphocytes de travailleurs exposés à des solvants organiques, mais l'exposition et les effets reliés à chacune des substances ne sont pas bien caractérisés.

Luo Y, Zhang M. Multimedia transport and risk assessment of organophosphate pesticides and a case study in the northern San Joaquin Valley of California. *Chemosphere.* 2009; 75(7):969-78.

Cet article présente une analyse du risque reliée aux mélanges des pesticides organophosphorés basée sur l'assomption de l'additivité de la dose; il ne présente aucune donnée originale sur les effets combinés de ces pesticides.

Pohl HR, Mumtaz MM, Scinicariello F et al. Binary weight-of-evidence evaluations of chemical interactions--15 years of experience. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2009; 54(3):264-71.

Cet article présente une analyse historique des évaluations de la toxicité des mélanges effectuée par l'Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) des États-Unis.

Stewart AG, Carter J. Towards the development of a multidisciplinary understanding of the effects of toxic chemical mixtures on health. *Environ. Geochem. Health.* 2009; 31(2):239-51.
Cet article ne rapporte aucune donnée originale sur la toxicité des mélanges. Cependant, il soulève des priorités de recherche qui ont été identifiées dans un récent colloque sur le sujet.

Zhao HX, damcakova-Dodd A, Hu D et al. Development of a synthetic PCB mixture resembling the average polychlorinated biphenyl profile in Chicago air. *Environ. Int.* 2009.

Cet article décrit la reconstitution d'un mélange de BPC et ne correspond pas à la thématique de la veille.

Lexique

- (1) Additivité: approche utilisée pour l'évaluation des mélanges quand les composantes agissent par le même mécanisme d'action. Selon ce concept, la toxicité des mélanges est déterminée par la somme des ratios des doses d'exposition et des doses effectives des composantes.
- (2) Plastifiant: diluant liquide qui rend les corps flexibles et souples.
- (3) Composant Phénoliques: polymères produits par réaction du phénol et du formaldéhyde.
- (4) MVLN: lignée cellulaire hormono-dépendante dérivée d'une tumeur mammaire.
- (5) NOEC: concentration sans effet observé.
- (6) LOEC: plus basse concentration efficace.
- (7) EC50: concentration efficace médiane, i.e. la concentration qui provoque une réponse biologique égale à 50 % de la dose maximale attendue.
- (8) Infra-additif: situation observée lorsque la toxicité du mélange est moins élevée que la somme des doses ou des réponses des composantes du mélange (antagonisme).
- (9) Polymorphisme génétique: correspond aux variations, dans une population, de la séquence des nucléotides de l'ADN d'un gène. Ce dernier doit posséder au moins deux formes (allèles) à une fréquence d'au moins 1 % pour être considéré comme polymorphe.
- (10) Supra-additif: situation observée lorsque la toxicité du mélange est plus élevée que la somme des doses ou des réponses des composantes du mélange (synergie, potentialisation).