

# Dulletin Connaître, évaluer, protéger de reille cientifique

Édition scientifique • Bulletin de veille n° 29 • Septembre 2016 Notes d'actualité scientifique Santé / Environnement / Travail



Le bulletin de veille présente régulièrement l'actualité scientifique, telle que perçue par les chercheurs qui signent les notes de lecture. Celles-ci traitent de sujets variés, dont certains en forte résonance avec l'actualité du moment. D'autres notes portent sur des sujets à plus bas bruit, et c'est propre à la veille de traiter de sujets qui ne sont pas sur le devant de la scène, mais qui pourraient l'être un jour.

La pollution de l'air, dont on sait qu'elle est la troisième cause de mortalité en France, cf. le très récent rapport de Santé publique France, est l'un de ces sujets d'actualité. Trois notes abordent ce thème, à travers l'impact de la pollution sur la santé des enfants, des adultes, et la question de la sensibilisation allergique. La recherche de biomarqueurs d'exposition, dont le suivi pourrait être réalisé sur des prélèvements biologiques non invasifs (expectorations) est présenté dans ce bulletin. L'Anses publie son septième numéro des Cahiers de la recherche, qui présente les projets financés sur le thème de la « Santé et pollution atmosphérique ».

A propos de biomarqueurs, les microARN, sont ici présentés comme de probables témoins d'exposition *in utero*; toutefois des travaux complémentaires sont nécessaires avant que l'on puisse relier les modifications observées aux expositions à des contaminants environnementaux.

Dans le domaine de l'environnement, deux notes communiquent sur la mise en œuvre de modèles *in silico* ou de stratégies de tests, intégrant les incertitudes actuelles, pour l'évaluation des risques, et prônent l'approche interdisciplinaire pour appréhender les risques associés aux nanotechnologies. La phytoremédiation est également abordée de façon tout à fait intéressante, par la culture de tomates et de tournesol sur des anciens sols viticoles chargés en cuivre. Toute la question est de trouver des cultures qui permettent une phytoextraction efficace sans exposer le potentiel consommateur au-delà de la limite maximale de résidus.

Dans un autre registre, une note traite des pertes auditives chez les jeunes, liées à l'exposition au bruit « de loisirs » et de l'impact de mesures de prévention. C'est un sujet d'actualité pour l'Anses qui a initié une collaboration avec Bruitparif, en vue de recueillir des données d'exposition à la musique amplifiée chez les jeunes.

La dernière note de ce numéro discute de publications faisant état de ce que pourraient devenir les relations entre science et droit qui, dans une société démocratique, pourraient favoriser à l'appréhension des savoirs mutuels. En effet, ce dialogue entre science et droit sert la décision que les agences sanitaires sont amenées à prendre pour la société.

**Gérard Lasfargues** 

#### Les approches alternatives in silico pour la prédiction des risques liés aux nanomatériaux manufacturés...... 9

#### Adeline TARANTINI

Les nanotechnologies offrent des perspectives d'innovations majeures dans de nombreux domaines. Cependant, les risques potentiels pour la santé et l'environnement sont encore difficiles à évaluer, notamment du fait des incertitudes concernant leurs dangers et les niveaux d'exposition associés. Les approches utilisées jusqu'alors ayant montré leurs limites, de nouvelles méthodes d'évaluation des risques doivent être envisagées. Dans ce but, les études citées proposent soit une méthodologie basée, sur l'introduction de tests simples nommés « tests fonctionnels » destinés à mesurer des paramètres clés sur lesquelles pourra s'appuyer la prévision du risque, soit une méthodologie intégrée basée sur une approche « système de systèmes » aboutissant à la génération d'un algorithme pour l'estimation du risque. Ces études illustrent le potentiel des outils informatiques et des algorithmes pour l'évaluation des risques liés aux nanomatériaux manufacturés.

#### 

#### Camille LARUE

Cette note se focalise sur le devenir dans l'environnement des nanotubes de carbone. En effet, ce problème est épineux puisqu'il s'intéresse à la détection et à la quantification de structures carbonées (les nanotubes) dans des matrices biologiques elles-mêmes carbonées. Ce manque de moyens techniques entraine un déficit d'études en écotoxicité des nanomatériaux carbonés. Les articles choisis détaillent les techniques développées pour parvenir à surmonter ce verrou en utilisant des animaux aquatiques (xénope) et dans le sol, ainsi que l'évaluation de la toxicité de nanotubes de carbone par une approche innovante chez des animaux terrestres (vers). La nécessité d'une approche pluridisciplinaire est mise en évidence.

#### 

#### Valérie ROZEC

Les jeunes s'exposent quotidiennement dans leurs loisirs à des niveaux de bruit élevés. Ces expositions volontaires peuvent conduire à des déficits auditifs précoces. Les auteurs évaluent l'audition des jeunes (otoscopie, audiométrie de tons purs, oto-émissions acoustiques et tympanométrie) en lien avec l'exposition cumulée au bruit mais aussi en lien avec les attitudes et les croyances envers le bruit. Les chercheurs australiens n'ont pas établi de liens entre les tests audiométriques et l'exposition cumulée aux bruits des loisirs sur un échantillon de 1432 sujets (11-35 ans). L'étude de Keppler *et al.* montre que les seuils d'audition ont augmenté de manière significative (5,68dB) pour les personnes ayant une attitude positive envers le bruit par rapport à ceux ayant une attitude négative. Cette attitude va avoir des conséquences sur le port des protections individuelles. Les campagnes doivent intégrer les représentations du bruit pour promouvoir des comportements sains.

#### Agents chimiques ......23

#### 

#### Jean-Christophe GARRIGUES

La prise en compte de l'exposition aux substances est une étape essentielle de la constitution du dossier règlementaire des pesticides. Cette mesure de l'exposition est particulièrement importante à réaliser pour les riverains des zones traitées. Cette évaluation est complexe, notamment pour les pesticides non persistants, qui sont rapidement métabolisés et éliminés de l'organisme après contact et absorption. Il est alors nécessaire de développer des méthodologies analytiques et des indices calculés, utilisant des données géographiques comme la surface de culture limitrophe de l'habitation, pour modéliser l'exposition totale des

riverains. L'utilisation de ces indices permet de relier les doses réellement absorbées aux effets sur la santé. Cette note présente des indices géographiques et un modèle d'exposition qui relie le taux de métabolites de pesticides à des effets neurotoxiques chez l'enfant.

#### Perturbateurs endocriniens, hormones de la reproduction et risque de cancer du sein .......30

#### Véronique MACHELON

L'article de M.Miao *et al.* (2015) suggère qu'une exposition à de fortes doses de BPA serait associée à une augmentation de la production de prolactine et de progestérone chez la femme. L'article de D.Roy *et al.* (2015) présente un travail de méta-analyses et de combinaison de données épidémiologiques et génomiques. Ces résultats mettent en évidence cinq gènes cibles des PEs dont l'expression est estrogéno-dépendante et qui sont également altérés dans les cancers du sein et les lésions de l'endométriose. Sans donner de preuves directes d'une implication des PEs dans le développement de ces deux pathologies, ces données ciblent des gènes d'intérêt pour envisager une étude plus approfondie des mécanismes d'action des PEs.

#### 

#### Mireille DEFRANCESCHI

Dans le contexte du retraitement des déchets de matières plastiques, il est bien établi que des dioxines, des furanes et des composés apparentés aux dioxines se forment au cours des étapes du traitement thermique. En raison de la présence de retardateurs de flamme bromés dans les matières plastiques, tous ces composés peuvent être soit bromés, soit contenir à la fois du chlore et du brome. Les mécanismes exacts de formation des dioxines/furanes et des composés apparentés ne sont pas totalement connus car il existe de très nombreux congénères halogénés mixtes et divers résultats indiquent que plusieurs mécanismes de formation sont en compétition selon les conditions opératoires. C'est ainsi que des études se poursuivent à différents niveaux. D'une part pour évaluer de façon globale les conséquences sur l'environnement d'un recyclage rudimentaire et d'autre part pour comprendre les mécanismes détaillés à l'origine de la formation des dioxines/furanes bromés et pour connaître les facteurs influençant la formation de tel ou tel composé.

#### 

#### Martine PERROT-APPLANAT

L'évaluation des effets de mélanges perturbateurs endocriniens (PE) est rendue difficile par l'existence d'un très grand nombre de polluants PE, de leurs combinaisons potentielles, et par le manque de connaissance des mécanismes moléculaires impliqués. Des travaux *in vitro* ont permis de fournir un début d'explication pour des actions antagonistes de PE via l'interrelation de deux récepteurs différents, AhR (communément appelé récepteur de la dioxine) et  $ER_{\alpha}$  (récepteur aux œstrogènes). L'étude in vivo présentée (modèle rongeur) montre que le 3-methylcholanthrene, ligand d'AhR, diminue les effets de l'æstradiol sur le développement de la glande mammaire et l'expression de gènes sensibles aux œstrogènes. Ces résultats sont en faveur d'interrelations entre les deux récepteurs préalablement observés in vitro. Ils sont à prendre en considération pour l'analyse des tumeurs hormono-dépendantes. La deuxième étude fournit des explications mécanistiques de l'action synergique de deux composés agissant via leur interaction simultanée avec un même récepteur (PXR). PXR est un récepteur clé dans la détoxification cellulaire. L'étude in vitro présentée indique l'activation anormale de PXR en exposition combinée d'un œstrogène (ethynylæstradiol) et d'un insecticide organochloré (transnonachlor), alors que ces deux composés sont faiblement actifs par euxmêmes.

#### Nouvelles méthodes biologiques de détoxification de produits céréaliers contaminés par des mycotoxines .... 44

#### Annie PFOHL-LESZKOWICZ

Les céréales sont souvent le substrat pour le développement des moisissures lors de leur culture et/ou de leur stockage. Ces moisissures produisent de redoutables mycotoxines, comme la patuline ou les aflatoxines, responsables respectivement, de désordres intestinaux ou de cancers hépatiques. Il est primordial de limiter

leur présence. Les études présentées dans cette note ont permis d'identifier des substances naturelles issues de plantes, notamment de la famille des choux, pouvant jouer le rôle d'antifongique. La lutte simultanée contre les insectes amplifie l'effet bénéfique de ces agents bioactifs.

Agents biologiques47
Utilisation des bactériophages en élevage ou en industrie agroalimentaire pour lutter contre les bactéries
pathogènes

#### Michel GAUTIFI

Les bactériophages (ou phages), virus infectant les bactéries, sont de plus en plus utilisés pour lutter contre les bactéries pathogènes. Leurs domaines d'application sont variés; thérapie humaine ou animale, assainissement des aliments ou lutte contre les biofilms en milieux agroalimentaire et hospitalier. Cette alternative aux antibiotiques est de plus en plus considérée par la communauté scientifique. Plusieurs difficultés techniques doivent cependant être surmontées. Toutes les souches de l'espèce ciblée doivent être sensibles au bactériophage et les bactéries peuvent devenir assez facilement résistantes à ces derniers. De plus, les phages ne doivent poser aucun risque sanitaire, ils doivent être produits aisément et leur utilisation ne doit pas bouleverser l'équilibre écologique microbien de l'environnement dans lequel on les utilise.

#### Les amibes libres, un cheval de Troie pour les bactéries pathogènes .......53

#### Jérôme GUERLOTTÉ

Les amibes libres que l'on retrouve dans l'eau et le sol se nourrissent principalement de bactéries. Toutefois, certaines espèces bactériennes parviennent à échapper à la digestion intracellulaire des amibes et utilisent les kystes amibiens très résistants, comme cheval de Troie pour survivre dans des milieux hostiles ou en présence de produits biocides. Les trois publications, sélectionnées ici, présentent les derniers travaux concernant ce phénomène de résistance mis à profit par des bactéries pathogènes des milieux hydriques. On découvre que le vibrion du cholera s'intègre et se réplique dans la vacuole contractile de l'amibe libre Acanthamoeba castellanii, tandis que Campylobacter jejuni résiste à l'acidité des jus de fruit en s'intégrant à l'amibe Acanthamoeba polyphaga et que Helicobacter pylori est capable de survivre à un traitement de chloration si la bactérie est associée à l'amibe Acanthamoeba castellanii.

#### Métagénomique : quelles avancées pour l'évaluation de l'exposition microbiologique domestique ?........... 58

#### Steffi ROCCHI et Gabriel REBOUX

Les performances des technologies NGS (Next Generation Sequencing) dans l'évaluation des communautés microbiennes seraient supérieures à celles des méthodes d'analyses "classiques" disponibles, puisqu'elles permettent un inventaire quasi-exhaustif des micro-organismes présents, en incluant la détection d'espèces non cultivables et/ou inconnues. Mais les publications actuelles montrent les limites de ces technologies qui ne permettent pour l'instant que très peu d'assignements au niveau de l'espèce. Les différents choix d'analyse, en termes de technologies utilisées, de région ciblée, de méthode de nettoyage des séquences, doivent être réfléchis en fonction de la question posée. Ces technologies demeurent pour l'instant limitées pour détecter des expositions potentiellement à risque pour la santé.

#### 

#### Florence MONDEGUER

La métabolomique, est une science récente et un outil encore peu utilisé dans le domaine des biotoxines marines. Pourtant cette approche est susceptible de rendre compte des modifications de la composition des biofluides en réponse à un processus de contamination. Dans le but de détecter des biomarqueurs prédictifs et des perturbations toxiques, l'application d'une approche métabolomique pourrait être intéressante pour caractériser à la fois le métabolisme des organismes producteurs de ces toxines (phytoplancton) mais aussi des organismes vivants dans des environnements naturels, perturbés ou pas par la présence de microalgues

toxiques, ou artificiels (expérience en milieux contrôlés, au laboratoire). L'intérêt de cette veille réside dans le fait que cette approche multidisciplinaire permet d'envisager de nouvelles stratégies de contrôle.

#### 

#### Anne OPPLIGER

Deux études longitudinales menées chez des agriculteurs en Hollande et au Danemark n'ont pu mettre en évidence un effet de travailleur sain, ni une différence de l'évolution, sur 15 ans, des paramètres fonctionnels respiratoires entre les jeunes agriculteurs et des témoins. Cependant, le fait d'être un agriculteur est associé à un effet négatif sur des paramètres respiratoires comparé aux ex-agriculteurs et cet effet est plus grand chez les femmes. Avoir grandi dans une ferme reste toutefois un facteur de protection important contre les allergies.

#### Réhabilitation d'anciens sites viticoles contaminés au cuivre.......70

#### Thierry LEBEAU

Des cultures de tomates et de tournesol ont été réalisées sur d'anciens sols viticoles contaminés au cuivre (Cu) afin de décider de maintenir la culture de plantes à usage alimentaire ou non (production d'énergie), du fait que ces plantes peuvent potentiellement servir en phytoextraction. Les tomates tolèrent des concentrations en Cu du sol pouvant atteindre 1 697 mg/Kg de sol sec bien qu'une réduction de la biomasse, de 10 à 50 % soit observée. Les teneurs en Cu accumulé dans les parties aériennes peuvent atteindre 1 229 mg/Kg de biomasse sèche pour 6 078 mg Cu/Kg de sol sec. Les teneurs en Cu dans la tomate dépassent légèrement le seuil de 5 mg/kg de la LMR lorsque les sols ont des teneurs en Cu sont plus élevées que la valeur moyenne mesurée dans les sols viticoles. Le tournesol accumule au maximum 41 mg Cu/Kg de biomasse sèche pour 507 mg/Kg de sol.

#### Pathologies......75

#### 

#### Hélène BAYSSON

Le radon, gaz radioactif d'origine naturelle, provient de la désintégration de l'uranium présent dans les sols et peut s'accumuler dans les bâtiments dans lesquels nous passons 90 % du temps. Le seul effet actuellement associé à l'inhalation de radon est l'induction de cancer du poumon (IARC, 1988) Cette relation exposition/risque est observée aussi bien chez les fumeurs que chez les non-fumeurs. Néanmoins, des études dosimétriques indiquent qu'une part de la dose due au radon et à ses descendants radioactifs peut être délivrée en dehors des poumons, en particulier à la moelle osseuse et à la peau. En dehors des études écologiques, l'étude de Braüner et al. est la première étude épidémiologique à évaluer directement le risque de cancer de la peau associé à l'exposition domestique au radon. L'étude de Torres-Duran et al. vise à mieux décrire le risque de cancer du poumon lié à l'exposition domestique au radon chez les non-fumeurs, en s'intéressant d'une part aux différents types histologiques de cancer et d'autre part à l'âge au diagnostic.

#### 

#### Andrea LASSERRI

La leucémie est le cancer le plus fréquent chez l'enfant de moins de 15 ans. Différents facteurs environnementaux sont suspectés dans le développement de cette maladie, dont les émissions du trafic routier. Les articles présentés analysent l'association entre l'exposition aux émissions des véhicules sur les routes à grande circulation, et le risque de leucémie pédiatrique, cette exposition contenant des composants cancérogènes. Les deux études réalisées avec un grand nombre d'enfants au niveau national, montrent un

risque augmenté de leucémie chez l'enfant habitant à proximité des routes et des artères d'agglomérations à fort trafic, en France et en Suisse. L'analyse de ces articles illustre la nécessité de renforcer les mesures de prévention pour réduire l'exposition des populations aux émissions de véhicules.

#### 

#### Agnès PETIT-PAITEL

Le chlorpyrifos est un pesticide dont l'utilisation, bien que restreinte à certains usages en Europe, reste très répandue dans le reste du monde notamment dans les pays en voie de développement. Bien que considéré comme modérément toxique, le CPF inhibe de manière irréversible des enzymes qui jouent des rôles vitaux dans les systèmes nerveux des insectes mais aussi des humains. Si les conséquences d'une intoxication massive de CPF chez l'Homme peuvent conduire à la mort, des faibles doses de CPF sont soupçonnées de perturber le fonctionnement cérébral, notamment durant le développement et chez l'individu jeune. Les études sélectionnées s'intéressent aux effets d'une exposition courte à des doses faibles chez le rat en période périnatale dans deux zones cérébrales impliquées respectivement dans la maladie de Parkinson et l'anxiété: la substance noire et l'amygdale. Le CPF induirait une réaction inflammatoire rapide qui pourrait avoir des répercussions sur la mort et le fonctionnement de certains neurones à l'âge adulte.

#### Outils et méthodes ......91

#### Validation de biomarqueurs d'exposition à la pollution de l'air .......92

#### Sylvain BILLET

La pollution de l'air cause chaque année la mort d'environ 8 millions de personnes. Afin de lutter contre ce fléau, la mise en place de campagnes de diagnostic de l'exposition à grande échelle est nécessaire. Celles-ci nécessitent tout d'abord de connaître un ou plusieurs biomarqueurs d'exposition fiables, qu'ils soient spécifiques ou non d'un type de pollution ou de contexte, par exemple le cas de l'air intérieur. L'utilisation effective sur le terrain de ces biomarqueurs pertinents ne se vérifiera toutefois que si les méthodes de mesure sont simples, rapides et peu onéreuses. Il est également indispensable que les matrices utilisées soient les moins invasives possibles. Dans cette note, seront ainsi mis en avant la mesure de marqueurs dans l'air exhalé ou dans l'expectoration induite.

#### 

#### Perrine MARTIN

Pendant la grossesse, le fœtus est potentiellement exposé aux mêmes polluants environnementaux que la mère par l'intermédiaire du placenta. Cette exposition peut s'avérer délétère pour le développement fœtal et la santé après la naissance. Les deux articles présentés analysent l'association entre l'exposition de femmes enceintes, d'une part à plusieurs types de polluants, comme des métaux ou des molécules organiques, d'autre part au bisphénol A, et l'expression de miARN dans des échantillons de placenta prélevés après accouchement ou avortement. Dans les deux cas, une modification du profil en miARN des échantillons placentaires est observée. Ces études sont préliminaires et mettent en lumière le potentiel des miARN comme biomarqueurs prénataux d'exposition voire d'effet aux polluants environnementaux.

#### Risques sanitaires et société ......103

#### 

#### Gilles MAIGNANT

L'étude des liens entre l'environnement et la santé mérite encore d'être approfondie. Cette note permet d'aborder l'exposition différenciée à la pollution de l'air tout au long de sa vie : que ce soit dans les premières

phases de sa vie (périnatalité, première année), dans sa mobilité quotidienne en tant qu'adulte (choix d'itinéraires vélos ou automobiles) ou encore en termes de mortalité quotidienne. Bien que les 3 articles sélectionnés ne s'appliquent pas aux mêmes espaces géographiques (Canada, USA, Grande Bretagne), les méthodologies mobilisées dans ces articles sont transférables à d'autres espaces et apportent un nouveau regard sur l'exposition à la pollution de l'air, tout en considérant de nombreux cofacteurs.

#### 

#### Marta TORRE-SCHAUB

Une meilleure intégration du droit et de la science nécessite d'une appréhension des savoirs mutuels. Les articles commentés analysent la place des connaissances scientifiques dans le processus législatif et juridique dans nos sociétés. Vérité scientifique et vérité juridique ne relèvent pas de la même légitimité car leurs contraintes de production relèvent de processus normés et complètement différents. Cela pose la question de la place des connaissances scientifiques dans le processus législatif et juridique dans nos sociétés modernes mues par les évolutions technologiques. Si nos sociétés souhaitent rester maîtresses de leurs développements scientifique et technologique, alors ce dialogue entre science et droit s'impose pour co-construire une vérité juste, et démocratiquement légitime et acceptable.

Les notes d'actualité scientifique reflètent le point de vue des équipes scientifiques partenaires et n'engagent nullement le Comité éditorial ou l'Anses



# de Jeille Connaître, évaluer, protéger de Jeille cientifique

Édition scientifique • Bulletin de veille n° 29 • Septembre 2016 Notes d'actualité scientifique Agents physiques

# Les approches alternatives in silico pour la prédiction des risques liés aux nanomatériaux manufacturés

Période : septembre 2015 à novembre 2015

Adeline TARANTINI | adeline.tarantini@cea.fr

(a) Université Grenoble Alpes, (b) CEA Grenoble - Laboratoire des lésions des acides nucléiques (LAN) - Grenoble – France et Université Aix-Marseille (AMU), CNRS, IRD - Centre de recherche et d'enseignement de géosciences de l'environnement - Aix-en-Provence - France

Mots clés: algorithmes, environnement, évaluation du risque, nanoinformatique, nanomatériaux manufacturés, modélisation, physico-chimie, santé, systèmes

Les nanotechnologies offrent des perspectives d'innovations pouvant répondre à des enjeux sociétaux et économiques majeurs. Cependant elles présentent également des risques potentiels pour la santé et l'environnement difficiles à évaluer à l'heure actuelle [1]. Ces difficultés relèvent à la fois d'incertitudes concernant les effets (éco)toxicologiques et des nanomatériaux manufacturés (NMs) d'une part, et des niveaux d'exposition d'autre part [2]. En effet, compte tenu de la diversité importante des NMs et des paramètres physico-chimiques susceptibles de modifier leur comportement et leur toxicité (taille, forme..), une étude de leurs dangers au cas par cas conduirait à un nombre de tests démesuré. Pour limiter le nombre de ces tests, des méthodes comme le groupement de NMs selon des propriétés communes ou les modèles QSAR\*[3,4] sont mis en œuvre. Cependant, dans le contexte d'incertitudes concernant certaines données scientifiques, ces méthodes s'avèrent insuffisantes et des méthodologies alternatives doivent être proposées [5][6]. Dans ce but, les deux études sélectionnées proposent des méthodologies originales, intégrant à la fois les propriétés physico-chimiques des NMs mais également celles du/des système(s) avec le(s)quels ils interagissent et qui sont susceptibles de transformer ces matériaux, tout au long de leur cycle de vie. La première approche est basée sur la définition d'essais fonctionnels pour renseigner des modèles, tandis que la deuxième s'appuie sur une approche « système de systèmes\* ».

#### Une stratégie basée sur les tests fonctionnels\* pour prévoir les risques liés aux nanomatériaux

**Hendren CO, Lowry GV, Unrine JM, Wiesner MR**. A functional assay-based strategy for nanomaterial risk forecasting *Sci Total Environ*. 2015; 536:1029-37.

#### Résumé

Partant du constat que la prévision des risques liés aux NMs sur la seule base de leurs propriétés physico-chimiques est problématique, les auteurs de cette étude proposent d'utiliser des tests fonctionnels\* décrits comme des tests simplifiés réalisés en laboratoire au sein de systèmes standardisés et bien caractérisés, représentatifs d'un environnement (ex: eau de mer artificielle, salive synthétique...etc). Par rapport à une stratégie reliant directement une propriété à un danger, le test fonctionnel est une étape intermédiaire, qui mesure dans un système donné un paramètre ayant une implication significative dans l'exposition ou le danger. Les auteurs identifient en particulier le taux de dissolution\* d'un NM, et l'affinité de surface\* comme des paramètres clés dictant le devenir des NMs dans l'environnement. Ces paramètres peuvent être mesurés par des tests fonctionnels simples, par exemple pour la dissolution, en ajoutant des nanoparticules dans une bassine d'eau représentative d'un milieu aquatique donné et en mesurant la quantité d'ions libérée au cours du temps.

A la fin, les valeurs obtenues pour ces paramètres permettront d'alimenter des modèles mathématiques à partir desquels il sera possible de prévoir le devenir, les effets et les risques potentiels du NM dans un environnement donné en fonction d'un scénario d'exposition donné. Cette stratégie implique i) d'avoir des protocoles qui permettent de distinguer les propriétés physico-chimiques intrinsèques\* des NMs de leurs propriétés extrinsèques ou dépendantes du système [7] ii) d'adopter des systèmes de référence, c'est-à-dire des systèmes standardisés, représentatifs des systèmes environnementaux et biologiques avec lesquels les NMs interagissent ainsi que des critères minimum permettant de les caractériser (exemples de critères pour l'eau de mer artificielle : température, composition ionique et minérale) iii) un contexte théorique ou scénario (ex: application d'un NM sur le sol comme fongicide). Les données obtenues en appliquant les tests fonctionnels aux NMs de référence et des systèmes de référence seront ensuite comparées aux résultats issus de systèmes plus complexes. En prenant comme exemple le cas des nanoparticules d'argent qui seraient déversées soit dans le sol (scénario A), soit dans les eaux usées (scénario B), les auteurs montrent que la prévision du risque basée sur les paramètres de dissolution et d'affinité concorde bien avec les résultats expérimentaux obtenus par ailleurs en exposant un ver (Caenorhabditis elegans) à ces nanoparticules [8].

#### Commentaire

Cette approche originale propose d'étudier le devenir et les effets des NMs dans le contexte d'un système donné, de façon standardisée, en soulignant l'importance d'utiliser des systèmes de référence décrits avec un minimum de critères pour pouvoir comparer les études entre elles. Cette stratégie est toutefois limitée par les incertitudes scientifiques concernant les nanomatériaux. Elle suppose en effet d'être en mesure d'identifier les paramètres les plus pertinents pour la prédiction des risques. Elle suppose également que la communauté scientifique s'accorde sur des systèmes de référence, des protocoles de référence, des systèmes de mesure harmonisés, ce qui fait défaut actuellement. Néanmoins, l'utilisation des tests fonctionnels permet d'identifier des processus clés gouvernant l'interaction et le devenir des NMs afin d'en mesurer les paramètres au sein d'un système et alimenter des modèles de prédiction des risques. Cette approche contribue ainsi à orienter les stratégies de recherche. On devine ici tout l'intérêt des études en mésocosme\* comme outil permettant de mesurer ces paramètres clés dans un environnement contrôlé. Enfin, en filigrane, se dessine une discipline en pleine émergence : la nanoinformatique [9,10] qui est amenée à modifier en profondeur les processus d'évaluation des risques.

# Une méthodologie scientifique intégrée pour évaluer les risques potentiels et l'incidence des nanomatériaux manufacturés

**Tolaymat T, El Badawy A, Sequeira R, Genaidy A**. An integrated science-based methodology to assess potential risks and implications of engineered nanomaterials. *J Hazard Mater.* 2015;298:270-81.

#### Résumé

Le développement durable est fondé sur trois piliers, trois systèmes interdépendants, qui sont la société, l'environnement et l'économie. Cette démarche nécessite d'évaluer les risques potentiels et les implications liés aux NMs, mais également les bénéfices attendus, et cela tout au long du cycle de vie du NM. Cependant, en matière d'évaluation des risques, les outils analytiques classiquement utilisés ne se focalisent généralement que sur un seul paramètre à la fois au sein de chaque pilier pris individuellement, et ne prennent pas en compte les interactions existantes entre eux. Dans ce contexte, les auteurs de cette étude proposent une méthodologie permettant d'évaluer les risques liés aux NMs de façon intégrée au sein du vaste système société-environnementéconomie. Pour cela, ils proposent de structurer les systèmes société-environnement-économie en système systèmes [11]. Dans cette représentation, il est possible d'évaluer les risques au sein de chaque système pris individuellement mais aussi d'établir les relations fonctionnelles et managériales existant entre ces différents systèmes interconnectés. Cette représentation dynamique permet ainsi d'établir les flux d'émission des NMs, leur devenir, leur transport depuis la source jusqu'au récepteur, c'est-à-dire tout au long du cycle de vie du NM. La méthodologie développée dans cette étude est basée sur deux phases qui sont, d'une part, une synthèse des

connaissances et d'autre part, une méthodologie d'algorithmes\* calculatoires. Dans la 1ère phase, l'ensemble des connaissances sur les NMs sont synthétisées en suivant la trame de l'architecture système de systèmes. Cette phase est présentée sous la forme d'un arbre décisionnel et découpée en trois étapes qui découlent les unes des autres : la première étape synthétise les connaissances en matière d'émission des NMs, la 2<sup>ème</sup> étape, le devenir et le transport des NMs dans les compartiments environnementaux et la 3<sup>ème</sup>, le devenir et la toxicité des NMs pour les espèces biologiques. Chacune de ces étapes est formalisée de façon plus détaillée sous la forme de nouveaux arbres décisionnels qui étayent et alimentent l'arbre décisionnel général. Si cette approche permet de synthétiser l'ensemble des connaissances sur les NMs, elle permet également d'identifier les lacunes en matière de connaissances scientifiques du point de vue des risques liés aux NMs. Il est proposé de combler ces lacunes en utilisant les informations disponibles sur des NMs analogues ou des matériaux non nanométriques, avec un degré d'incertitude. Les informations synthétisées au cours de cette 1ère phase constituent des variables d'entrée pour l'algorithme calculatoire destiné à quantifier les implications et les risques liés à l'exposition aux NMs. Etant donné la complexité des interactions entre les systèmes et les incertitudes scientifiques existantes, l'évaluation du risque nécessite de recourir au raisonnement approximatif\* qui consiste à raisonner avec de l'imperfection. Pour cela, l'approche calculatoire utilise, d'une part, des variables linguistiques\*, à défaut de variables numériques, pour caractériser les propriétés physico-chimiques des NMs et d'autre part, les algorithmes flous\* pour décrire des relations complexes. Pour les auteurs de cette étude, l'idée à plus long terme est de construire un outil d'aide à la décision qui guiderait les parties prenantes vers une production durable de NMs et de nanoproduits, c'est-à-dire des produits qui apportent des bénéfices (au-delà des gains économiques) et qui ne présentent aucun risque ou alors un risque minimum pour le système société-environnement-économie.

#### Commentaire

L'originalité de cette méthodologie réside dans la structuration des trois systèmes société-environnementéconomie en système de systèmes, permettant d'évaluer les risques en tenant compte des interactions dynamiques existant entre ces systèmes. Par rapport aux méthodologies courantes, celle qui est proposée ici est adaptée à la fois pour les NMs bruts mais également pour les nanoproduits. Il faut également souligner la prise en compte non seulement des caractéristiques physico-chimiques des NMs, mais également des modes de transfert, des transformations environnementales et biologiques ainsi que des voies d'exposition. Cependant, cette méthodologie peut être limitée par la qualité des données scientifiques disponibles sur les NMs. En particulier, la question des critères de sélection des études scientifiques retenues pour la phase de synthèse des connaissances n'est pas clairement explicitée. De plus, on peut se demander comment sont prises en compte les incertitudes associées au risque lorsque celui-ci est exprimé par des variables linguistiques. Néanmoins, cette méthodologie a le mérite de prendre en compte dans sa globalité et sa complexité la problématique des risques et à plus long terme des bénéfices attendus des NMs. A noter qu'au niveau européen le projet SUN\* (The Sustainable Nanotechnologies project) financé par la Commission Européenne (EU FP7 research programme) a également pour objet la conception d'outils d'aide à la décision pour le développement durable des nanotechnologies.

#### **C**ONCLUSION GÉNÉRALE

Ces deux études illustrent l'intérêt d'utiliser des approches intégrées pour l'évaluation des risques liés aux NMs et l'aide à la décision, par rapport aux approches traditionnelles qui se focalisent généralement sur un seul paramètre. De plus, ces études soulignent l'apport des outils informatiques, et des algorithmes permettant de construire des modèles pour prévoir les risques mais également les bénéfices attendus des NMs. Les méthodologies proposées ne se substituent pas à l'expérimentation mais permettent de mettre en évidence les lacunes en matière de connaissances scientifiques et tentent de les combler en élaborant des tests simplifiés ou en utilisant une approche par raisonnement approximatif pour fournir de nouvelles informations pertinentes pour l'évaluation du risque en attendant que de nouvelles connaissances soient disponibles. La nanoinformatique apparait ainsi comme une discipline à fort potentiel pour s'attaquer à la problématique environnement, santé et sécurité dans le domaine des nanotechnologies, laissant entrevoir la possibilité de collecter, organiser, partager des données, développer ou affiner des théories, des modèles ou des simulations. Il est attendu que ces méthodologies contribuent au développement de nanoproduits durables, c'est-à-dire des produits dont la valeur ajoutée est démontrée et qui ne posent pas de risque pour les constituants du système société-environnementéconomie, que ce soit au niveau des procédés de fabrication, de l'utilisation des produits ou encore du recyclage et de la gestion des déchets.

#### **GENERAL CONCLUSION**

Both studies emphasize the interest of using integrated approaches to assess risks of nanomaterials and decision-support system in contrast with classic approaches which commonly focused on studying individual endpoints. In addition, these studies underline the contribution of computational tools and algorithms resulting in the construction of models for risks assessment as well as benefits perspectives. The methodologies while not replacing the need for measurement, allow overcoming gaps in knowledge by designing simple tests or applying the approximate reasoning approach to get relevant information for risk assessment until new knowledge is available. Nanoinformatics appears therefore as a promising field to adress nano health, environment, safety issues, with the perspectives of amassing, organizing, sharing data, build or refine theories, models or simulations. These methodologies are expected to support nano-enabled product development, which means products with value added benefits and safe for the constituents of the society-environment-economy system at the levels of both manufacture processes, use, recycling and waste management.

#### Lexique

Affinité de surface : Valeur qui décrit la probabilité qu'une particule s'attache à une autre particule ou à une surface après être entrée en collision.

**Algorithme**: Utilisé en mathématique et en informatique, un algorithme est un processus composé d'un nombre infini d'opérations permettant de répondre à un problème.

Algorithmes flous : Séquence ordonnée d'instructions composée de propositions floues et d'énoncés conditionnels. L'exemple cité dans le texte est le suivant : si la chimie de surface est « légèrement élevée » ET que les caractéristiques physique du matériaux sont qualifiées de « grand » ET SI la composition du matériau est « xxx » (inconnu) ALORS la réactivité de surface est « très élevée »

**Arbre décisionnel**: Outil d'aide à la décision représentant un ensemble de choix sous la forme graphique d'un arbre.

**Mésocosme** : Système expérimental qui simule des conditions aussi proches que possible de l'environnement tout en contrôlant un certain nombre de ces conditions.

**Projet SUN** : Sustainable Nanotechnologies project : http://www.sun-fp7.eu/

**Propriété intrinsèque**: Propriété inhérente au matériau, qui lui donne son identité par opposition à propriété extrinsèque qui constitue une propriété « acquise » sous l'effet de l'interaction avec un système

**QSAR**: De l'anglais *Quantitative structure—activity* relationship – (Relation quantitative entre la structure

et l'activité). Modèle qui vise à corréler les propriétés physico-chimiques d'une substance chimique à l'un des effets de cette substance (réactivité biologique, accumulation...)

Raisonnement approximatif: Mécanisme capable d'utiliser et de prendre en compte des connaissances imprécises, floues ou incertaines pour produire de nouvelles connaissances, à l'image du raisonnement humain.

Système de systèmes: Ensemble de systèmes autonomes interconnectés et coordonnés pour satisfaire une capacité ou des fonctions spécifiques que les systèmes autonomes ne pourraient réaliser.

**Taux de dissolution**: Mesure de la vitesse à laquelle un soluté, ou ici une nanoparticule, se dissout dans un solvant.

Tests fonctionnels : Ce sont des tests simples réalisés en laboratoires et dont le but est de quantifier des paramètres clés, qui permettront par la suite de prédire le comportement ou le devenir d'un NM dans l'environnement.

**Variable linguistique**: Variables dont les valeurs sont des mots (ex: élevé, faible, modéré etc...pour qualifier la réactivité de surface)

#### Publications de référence

- 1 **lavicoli I, Leso V, Ricciardi W, et al.** Opportunities and challenges of nanotechnology in the green economy. *Environ Health* 2014;**13**:78.
- 2 **Grieger KD, Hansen SF, Baun A**. The known unknowns of nanomaterials: Describing and characterizing uncertainty within environmental, health and safety risks. *Nanotoxicology* 2009;**3**:222–33.
- 3 Winkler DA, Burden FR, Yan B, *et al.* Modelling and predicting the biological effects of nanomaterials. *SAR QSAR Environ Res* 2014;**25**:161–72.
- 4 **Sayes C, Ivanov I.** Comparative Study of Predictive Computational Models for Nanoparticle-Induced Cytotoxicity. *Risk Anal* 2010;**30**:1723–34.
- 5 Cohen Y, Rallo R, Liu R, et al. In Silico Analysis of Nanomaterials Hazard and Risk. Acc Chem Res 2013;46:802–12.
- 6 Som C, Nowack B, Krug HF, et al. Toward the Development of Decision Supporting Tools That Can Be Used for Safe Production and Use of Nanomaterials. *Acc Chem Res* 2013;**46**:863–72.
- 7 Lynch I, Weiss C, Valsami-Jones E. A strategy for grouping of nanomaterials based on key physico-chemical descriptors as a basis for safer-by-design NMs. *Nano Today* 2014;9:266–70.
- 8 Starnes DL, Unrine JM, Starnes CP, et al. Impact of sulfidation on the bioavailability and toxicity of silver nanoparticles to Caenorhabditis elegans. *Environ Pollut* 2015;196:239–46.

- 9 Harper SL, Hutchison JE, Baker N, et al. Nanoinformatics workshop report: Current resources, community needs, and the proposal of a collaborative framework for data sharing and information integration. Comput Sci Discov 2013;6:014008.
- 10 **Panneerselvam S, Choi S**. Nanoinformatics: Emerging Databases and Available Tools. *Int J Mol Sci* 2014;**15**:7158–82.
- 11 **Tolaymat T, El Badawy A, Sequeira R**, *et al.* A system-of-systems approach as a broad and integrated paradigm for sustainable engineered nanomaterials. *Sci Total Environ* 2015;**511**:595–607.

#### Revues de la littérature parues en 2015

Fadel TR, Steevens JA, Thomas TA, et al. The challenges of nanotechnology risk management. Nano Today 2015;10:6–10. doi:10.1016/j.nantod.2014.09.008

Garduño-Balderas LG, Urrutia-Ortega IM, Medina-Reyes EI, et al. Difficulties in establishing regulations for engineered nanomaterials and considerations for policy makers: avoiding an unbalance between benefits and risks. J Appl Toxicol 2015;35:1073–85.

**Hussain SM, Warheit DB, Ng SP, et al.** At the Crossroads of Nanotoxicology in vitro: Past Achievements and Current Challenges. *Toxicol Sci* 2015;**147**:5–16.

**Lewinski NA, McInnes BT.** Using natural language processing techniques to inform research on nanotechnology. *Beilstein J Nanotechnol* 2015;**6**:1439–49.

**Subramanian V, Semenzin E, Hristozov D**, et al. Review of decision analytic tools for sustainable nanotechnology. *Environ Syst Decis* 2015;**35**:29–41.

#### Autres publications identifiées

Bates ME, Keisler JM, Zussblatt NP, et al. Balancing research and funding using value of information and portfolio tools for nanomaterial risk classification. *Nat Nanotechnol* Published Online First: 9 November 2015

Cette étude propose d'appliquer des méthodes pour des opérations de communément utilisées management et de finance dans le but de prioriser la recherche sur les risques liés aux NMs. L'idée est d'identifier les expérimentations qui permettent de réduire les incertitudes sur les dangers des NMs, au moindre coût. Ils prennent comme modèle d'étude les nanotubes de carbone multiparoies, nanoparticules d'argent et dioxyde de titane. En passant en revue les données de la littérature disponibles sur ces 3 NMs, des scores de dangers sont établis et des modèles probabilistes appliqués (simulation monte Carlo). Les auteurs définissent pour ces NMs, que les expérimentations portant sur la forme, le diamètre, la solubilité et la surface de réactivité sont celles avant le plus de potentiel pour améliorer la classification des dangers au moindre coût.

**Oomen AG, Bleeker EAJ, Bos PMJ**, *et al*. Grouping and Read-Across Approaches for Risk Assessment of Nanomaterials. *Int J Environ Res Public Health* 2015;**12**:13415–34

Cet article présente différentes méthodes de groupement des NMS ainsi que des approches par croisement d'information avec d'autres matériaux nanométriques ou des matériaux non nanométriques afin de réduire le nombre de tests nécessaires dans l'approche cas par cas.

**Quik JTK, de Klein JJM, Koelmans AA.** Spatially explicit fate modelling of nanomaterials in natural waters. *Water Research* 2015;**80**:200–8

Les auteurs de cette étude proposent un modèle de prévision du devenir des NMs dans les milieux aquatiques, qui, par rapport aux modèles de bilans massiques utilisés jusqu'à présent tient compte de l'hétérogénéité de ces milieux. Par une simulation (nanoparticules d'argent et de cerium relargués dans la « rivière Dommel »), ils mettent en évidence que la composante spatiale du modèle permet de prévoir des pics de contamination dans la colonne d'eau et les sédiments. Ils démontrent sur la base de différents scénarios que la négligence de cette dimension spatiale conduit à une sous-estimation de la concentration locale en nanoparticules dans les sédiments.

#### Liens d'intérêts :

# Où en est-on au sujet de l'écotoxicologie des nanotubes de carbone ?

Période : septembre 2015 à novembre 2015

Camille LARUE | camille.larue@ensat.fr

CNRS - Laboratoire d'écologie fonctionnelle et environnement (Ecolab) - Toulouse - France

Mots clés : écotoxicologie, environnement, détection, nanotube de carbone, sol, toxicité

Malgré leur utilisation industrielle et leur présence dans l'atmosphère, l'étude du devenir des nanotubes de carbone (NTC) dans l'environnement est limitée. En particulier, il est difficile de quantifier leur présence dans les matrices organiques (plantes, sols, animaux,...) elles-mêmes composées de carbone. Les NTC représentent ainsi un problème spécifique du point de vue (éco) toxicologique parmi les autres nanomatériaux et ces difficultés de détection engendrent finalement un déficit d'études pour évaluer leur toxicité. Pour autant, l'industrie utilise ces nanomatériaux dans les nanocomposites, les articles de sport ou encore les batteries (1). Selon la plateforme R'nano de l'Anses, il en serait produit et/ou importé environ 100 T par an en France (2). D'autre part, une étude a récemment démontré la présence chronique de NTC dans les poumons d'enfants parisiens (3). Ainsi, cette note s'articule autour de deux articles illustrant les méthodes de détection actuellement disponibles ainsi que les évolutions techniques mises au point pour localiser les NTC dans des embryons d'amphibiens et les quantifier dans l'environnement. Le troisième article choisi se focalise, quant à lui, sur l'étude de la toxicité des NTC pour un nématode, le ver *Caenorhabditis elegans*.

# Distribution de nanotubes de carbone simple feuillet dans un embryon de Xénope après microinjection

**Holt BD, Shawky JH, Dahl KN, Davidson LA**, Islam MF. Distribution of single wall carbon nanotubes in the *Xenopus laevis* embryo after microinjection. *J Appl Toxicol 2016; 36: 568–578* 

#### Résumé

Cet article présente le couplage de deux techniques d'imagerie pour localiser les NTC simple feuillet (oxydés en surface et homogénéisés en suspension par ultra-sons) dans un embryon d'amphibien (xénope). Les NTC sont détectés par spectroscopie Raman alors que les différents tissus animaux et organites\* sont marqués par des fluorophores et analysés par microscopie confocale (en mode fluorescence). Les analyses étant réalisées sur le même échantillon, les images peuvent être comparées pour en tirer des conclusions sur la localisation et les effets des NTC au niveau anatomique.

Après une microinjection de 3 ng de NTC, ceux-ci sont détectés partout dans l'embryon (en particulier dans l'espace périnucléaire\*) avec une distribution hétérogène comprenant des points très concentrés et des zones plus diffuses. Ils sont principalement présents sous forme de tubes isolés. Ils peuvent être transmis d'une génération de cellules à l'autre par division cellulaire, et *a priori* sans transfert direct. Aucune altération des structures subcellulaires telles que l'actine\*, le réticulum endoplasmique ou les vésicules n'a pu être détectée par microscopie et aucun effet délétère sur le développement de l'embryon n'a été mis en évidence. Les auteurs concluent donc que ces NTC simple feuillet hautement purifiés ne sont pas toxiques pour les embryons de xénope et sont donc utilisables pour des applications en biotechnologie.

#### Commentaire

L'angle d'étude de cet article diffère des articles habituellement décrits dans cette note. En effet, ici les interactions des nanomatériaux avec le vivant sont abordées sous l'aspect de l'application biotechnologique plutôt que sous celui de l'écotoxicologie : micro-injections, fortes doses, dispersant, NTC manufacturés courts. Néanmoins, l'approche instrumentale est très intéressante puisqu'elle permet à la fois de détecter la présence des NTC (et de la quantifier) mais également de la situer au niveau subcellulaire grâce au marquage des structures cellulaires par des fluorophores. Cette approche est optimale pour des cultures cellulaires; pour d'autres types d'échantillons (tissus animaux, végétaux), elle requiert une préparation de coupes transversales pour pouvoir être précise. Or, à ce jour, la préparation de coupes fines reste un défi pour éviter l'apparition d'artefacts.

Deux critiques peuvent néanmoins être formulées pour cette étude : l'une mineure, concerne la préparation nanomatériaux avant injection (oxydation ultrasonification). Il a été démontré que ce type de dispersion peut induire des modifications de la structure des matériaux ainsi que dans certains cas la génération d'espèces réactives de l'oxygène (4). La deuxième remarque concerne la conclusion de l'étude qui est la non-toxicité des NTC. Cette conclusion est basée uniquement sur des critères morphologiques ce qui semble restrictif surtout si l'on considère que les NTC sont détectés concentrés dans l'enveloppe périnucléaire. En effet, d'autres études ont repéré des effets génotoxiques sur le même organisme à un stade plus avancé (5). Il serait donc utile de tester d'autres critères de toxicité comme par exemple les dommages à l'ADN avant de conclure.

### Détection sélective et quantification des nanotubes de carbone dans un sol

**Jeong J, Lee YJ, Hwang YS, Hong IS.** Selective detection and quantification of carbon nanotubes in soil. *Environ Toxicol Chem* 2015; **34**(9): 1969-74.

#### Résumé

Les auteurs présentent une nouvelle technique pour détecter et quantifier les NTC (simple ou multi-feuillets) de façon sélective dans les eaux et les sols (en mélange avec du graphène). La première étape consiste à isoler les NTC de leur matrice : pour cela de l'ADN simple brin lié à de la biotine\* est introduit dans le système. L'ADN a une très forte affinité pour les NTC et va venir s'adsorber à leur surface. Dans un deuxième temps, on ajoute à ce système de la streptavidine - elle-même liée à de petites billes magnétiques - qui va venir se lier fortement à la biotine. On a donc un assemblage NTC-ADN-biotine-streptavidine-bille magnétique. Ce complexe est retenu par une plaque magnétique et le reste du surnageant est éliminé. Le complexe, ainsi isolé, sera dissocié en le chauffant pour récupérer uniquement les NTC. Un marqueur fluorescent (SYBR Green I) est ensuite ajouté à la suspension de NTC ; la diminution de fluorescence consécutive à la liaison du fluorophore aux NTC permet de déterminer la concentration en NTC. La limite de détection ainsi atteinte est de 250 μg. kg<sup>-1</sup>de sol Les auteurs concluent que cette technique pourrait également être appliquée à d'autres matrices biologiques comme des poissons.

#### Commentaire

Comme il est présenté dans l'introduction de cet article, l'élaboration de nouvelles méthodes pour quantifier les NTC dans des matrices complexes répond à une problématique récurrente des dernières années. Néanmoins, quelques questions demeurent par rapport à cette étude. Les auteurs insistent sur l'étape d'oxydation des NTC avant tout dosage ce qui permet leur individualisation dans le milieu, mais quel serait le résultat avec des NTC non oxydés au préalable et qui seraient potentiellement agglomérés? Existe-t-il un diamètre seuil pour les NTC au-delà duquel l'ADN ne peut plus les enrober (ici le diamètre maximal testé est de 15 nm)? Quelle était la nature du sol utilisé pour les tests, est ce que sa richesse en matière organique pourrait être un facteur limitant à la séparation des NTC? A quel point la technique est-elle transférable à d'autres matrices biologiques complexes (animales ou végétales)? Cet article représente donc un progrès dans le domaine mais appelle à un approfondissement des recherches dans cette direction.

Une approche toxicologique sur les mécanismes de toxicité et d'internalisation des nanotubes de carbones multi-feuillets chez Caenorhabditis elegans

Eom HJ, Roca CP, Roh JY, Chatterjee N, Jeong JS, Shim I, Kim HM, Kim PJ, Choi K, Giralt F, Choi J. A systems toxicology

approach on the mechanism of uptake and toxicity of MWCNT in Caenorhabditis elegans. Chem Biol Interac 2015; **239**: 153-63.

#### Résumé

Des vers ont été exposés à deux types de NTC: des multifeuillets bruts ou oxydés. Les NTC bruts n'ont entrainé aucune mortalité jusqu'à 500 mg.L<sup>-1</sup> mais altérent la reproduction à partir de 1 mg.L<sup>-1</sup>. Suite à une exposition de1 mg.L<sup>-1</sup>, l'expression des gènes a été étudiée (puces à ADN) ainsi que leur traduction en protéines (protéomique), les résultats ont ensuite été examinés par analyse en réseau biologique. Au niveau des gènes, les modifications observées étaient plus importantes après 24h qu'après 4h d'exposition et la majorité des gènes était sous-exprimée par rapport au témoin non exposé aux NTC. L'analyse combinée des résultats de transcriptomique et de protéomique a suggéré une forte implication de la phagocytose - et dans une moindre mesure de l'endocytose - comme mécanismes d'internalisation ainsi que du stress oxydatif et d'un stress lié au réticulum endoplasmique comme responsable de la toxicité. Dans un deuxième temps, ces informations ont été confirmées en utilisant des mutants pour des gènes impliqués dans chacune de ces voies métaboliques. Par exemple, les auteurs ont mesuré une augmentation de l'expression des gènes liés à la phagocytose après exposition aux NTC et une réduction de la toxicité chez des mutants dont l'expression de ces gènes avait été inhibée.

#### Commentaire

Cet article illustre le développement des techniques appelées « omiques » qui englobent la transcriptomique et la protéomique. Ces technologies, apparues lors du projet « Génome Humain » dans les années 1990, s'appliquent à d'autres organismes en permettant une approche nouvelle et sans a priori des questions de recherche. En effet, ces techniques génèrent des quantités massives de données qui couvrent tous les mécanismes impliqués dans les variations qui se produisent dans les réseaux cellulaires et qui influencent le fonctionnement des systèmes organiques dans leur totalité. A partir de ces résultats et à l'aide d'une analyse informatique poussée (analyse en réseau biologique), les chercheurs formulent des hypothèses qu'ils vérifient dans un deuxième temps comme le montre l'utilisation des mutants dans l'expérience. Cette étude montre aussi les limites actuelles de ce système : pour être efficace cette approche doit reposer sur des modèles et bases de données adaptés à chaque organisme-test. Ici, les chercheurs se sont appuyés sur un modèle créé pour l'humain et la souris ce qui limite la puissance de leur modélisation.

#### **CONCLUSION GÉNÉRALE**

Les articles sélectionnés mettent en avant le rapide développement technologique associé à la question émergente de l' (éco) toxicologie des nanomatériaux. Les techniques préexistantes sont développées et adaptées pour l'investigation des nanomatériaux. C'est le cas par exemple de la spectroscopie Raman qui est la technique la plus répandue pour localiser les NTC (de façon plus marginale, on trouve aussi l'utilisation de NTC (radio) marqués ou la détection photothermale photoacoustique, (6) qui peut être couplée à d'autres techniques de microscopie. C'est également le cas de l'assemblage utilisé pour quantifier les NTC dans un sol. De même, l'approche omique est toujours en expansion aujourd'hui en biologie moléculaire et est petit à petit appliquée aux questionnements relatifs nanomatériaux. Cela confirme et renforce donc l'affirmation qu'une approche interdisciplinaire est nécessaire pour appréhender le problème des risques associés aux nanotechnologies. Malgré les efforts fournis, ce domaine a encore besoin de recherches et d'innovations pour optimiser les développements récents et obtenir des techniques performantes qui permettront d'élucider le challenge du devenir des nanomatériaux carbonés dans l'environnement.

A ce jour, il existe un réel déficit de connaissances dans ce domaine.

#### GENERAL CONCLUSION

The selected articles highlight the fast evolution of techniques associated with the emerging question of nanoparticle (eco)toxicology. Existing techniques have been further developed and adapted for the investigation of nanoparticles in biological matrices. It is the case for the Raman spectroscopy which is the most widespread technique to localize carbon nanotubes and which has been coupled with other microscopic imaging techniques. Occasionally, the use of (radioactive) labeling or photothermal and photoacoustic detection is also mentioned in the literature (6). This is the same for the assembly used to quantify carbon nanotubes in soil which is a basic tool in molecular biology. Likewise, the omics approach increasingly used nowadays in molecular biology is now gradually applied to nanomaterial issues. This confirms that a multidisciplinary approach is mandatory to investigate the risks associated with nanomaterial dissemination in the environment. Despite all the progress made, there is still place for improvement of recent developments to turn them into efficient tools that will allow answering the challenging question of carbon nanotube fate in the environment. So far, research in this area has been delayed.

#### Lexique

Actine : C'est une protéine importante pour l'architecture et les mouvements cellulaires. Elle est présente dans toutes les cellules du corps et peut représenter jusqu'à 15 % de la masse totale protéique des cellules.

**Biotine-streptavidine**: L'attachement de la biotine à différents sites chimiques (biotinylation) est couramment utilisé en biologie moléculaire pour étudier la localisation des protéines ou encore liée à l'ADN pour étudier sa transcription et sa réplication.

La streptavidine est connue pour son affinité exceptionnellement haute pour la biotine. C'est l'une des plus fortes interactions connue dans la nature.

**Espace périnucléaire** : Espace compris entre la double membrane délimitant le noyau (et donc l'ADN) du cytoplasme de la cellule

**Organite** : Structure spécialisée, localisée à l'intérieur des cellules et délimitée par une membrane (par exemple : les mitochondries, les chloroplastes ou le reticulum endoplasmique)

#### Publications de référence

- 1. Herrero-Latorre C, Alvarez-Mendez J, Barciela-Garcia J, et al. Characterization of carbon nanotubes and analytical methods for their determination in environmental and biological samples: a review. Anal Chim Acta 2015; 852: 77-94
- 2. Ministère de l'Ecologie, du développement durable et de l'Energie. Elements issus des déclarations des substances à l'état nanoparticulaire : rapport d'étude. Novembre 2014.
- **3.** Kolosnjaj-Tabi J, Just J, Hartman KB, *et al.* Anthropogenic carbon nanotubes found in the airways of Parisian children. *Ebiomedicine* 2015; **2(11)**: 1697-1704.
- 4. **Taurozzi JS, Hackley VA, Wiesner MR**. Ultrasonic dispersion of nanoparticles for environmental, health and safety assessment–issues and recommendations. *Nanotox* 2011; **5(4)**: 711-29.
- 5. Saria R, Mouchet F, Perrault A, et al. Short term exposure to multi-walled carbon nanotubes induces oxidative stress and DNA damage in *Xenopus laevis* tadpoles. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2014; 107: 22-9.
- Khodakovskaya MV, de Silva K, Nedosekin DA, et al. Complex genetic, photothermal, and photoacoustic analysis of nanoparticle-plant interactions. *Proc Natl Acad Sci.* 2011; 108(3):1028-33.

#### Revues de la littérature

**Petersen EJ, Zhang L, Mattison NT,** *et al.* Potential release pathways, environmental fate and ecological risks of carbon nanotubes. *Environ Sci Technol* 2011; **45**: 9837-56.

Jackson P, Raun-Jacobsen N, Baun A, et al. Bioaccumulation and ecotoxicity of carbon nanotubes. Chem Cent J. 2013; 7:154

#### **Autres publications**

**Chen G, Qiu J, Liu Y** et al. Carbon nanotubes act as contaminant carriers and translocate within plants. *Sci Rep* 2015; **5**: 15682.

Cet article met en évidence le rôle de vecteur que les nanotubes peuvent avoir envers d'autres contaminants de l'environnement (comme les pesticides). Les NTC sont ici aussi détectés dans les plantes par une technique dérivée de la spectroscopie Raman.

Viana C de O, Vaz RP, Cano A, et al. Physiological changes of the lichen *Parmotrema tinctorum* as result of carbon nanotubes exposition. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2015;**120**:1106 Cette étude s'intéresse à l'utilisation de lichens pour évaluer l'impact d'une contamination atmosphérique de NTC. Le lichen représente un organisme sentinelle souvent employé pour évaluer la pollution atmosphérique.

Wang R, N Meredith A, Lee M Jr, et al. Toxicity assessment and bioaccumulation in zebrafish embryos exposed to carbon nanotubes suspended in Pluronic® F-108. Nanotoxicology. 2015; 11: 1-10.

Les auteurs constatent que la toxicité de leur suspension de NTC provient de la sonification de l'agent dispersant (Pluronic). La toxicité des NTC est faible même s'ils sont internalisés dans les embryons de poisson (spectroscopie Raman).

#### Liens d'intérêts :

□ Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt

# Exposition volontaire à la musique à volume élevé : attitudes et pertes auditives

Période : septembre 2015 à Décembre 2015

Valérie ROZEC | rozec@cidb.org

Centre d'information et de documentation sur le bruit CIDB - Paris - France

Mots clés : attitudes, audition, exposition au bruit dans les loisirs, jeunes, pertes auditives

L'exposition à la musique à volume élevé est devenue un véritable enjeu de santé publique : en effet, pendant les concerts, les soirées en discothèque, les niveaux sonores atteints peuvent être dangereux, traumatiques sur le plan physiologique. Les pratiques d'écoute de la musique avec casque ou avec des oreillettes se sont aussi beaucoup développées ces dernières années.

Si la dose de son tolérable, qui est fonction du niveau sonore et de la durée d'écoute, est dépassée, le système auditif risque une usure prématurée, ce qui constitue à terme un véritable handicap. Ce risque est insidieux car il apparaît à des niveaux sonores bien inférieurs au seuil de la douleur ressentie par l'individu. Par ailleurs, cette détérioration, qui atteint les cellules ciliées de l'oreille interne, n'est pas "réparable" à l'heure actuelle par la médecine.

Ces deux articles tentent de mettre en évidence une baisse des seuils d'audition chez les jeunes, liée à l'écoute intensive de musique dans les loisirs. Le premier article fait le lien entre l'exposition cumulée au bruit dans la vie quotidienne et les tests audiométriques tandis que le second article vise plutôt à corréler les attitudes, les croyances envers le bruit à ces mêmes tests auditifs.

## Les seuils d'audition des sons purs et le bruit des loisirs : y a-t-il une relation ?

Williams W, Carter L, Seeto M. Pure tone hearing thresholds and leisure noise: Is there a relationship? Noise Health 2015;17358-63

#### Résumé

Cette étude australienne transversale sur un échantillon de 1432 personnes de 11 à 35 ans a pour objectif de mettre en relation les indicateurs audiométriques (otoscopie, audiométrie tonale, oto-émissions acoustiques et tympanométrie) et l'exposition au bruit cumulée estimée au travail et dans les loisirs.

Les participants étaient invités à répondre à un questionnaire décrivant leur exposition quotidienne au bruit à travers les loisirs bruyants (musique, sports mécaniques, armes à feu...). Des tests audiométriques ont été réalisés sur place. Aucune preuve de changement de seuils d'audition dû à l'exposition au bruit des loisirs n'a été mise en évidence. De même il n'y a pas de différences significatives selon le sexe en fonction de l'exposition au bruit.

#### Commentaire

L'intérêt de cet article est d'évaluer les pertes auditives ou les déplacements de seuils d'un très large échantillon en lien avec l'exposition au bruit. Cependant l'exposition au bruit cumulé au cours de la vie est modélisée et ne représente pas l'exposition réelle de l'individu. L'article conclut à une absence de corrélation entre leurs évaluations d'exposition au bruit dans la vie quotidienne et les seuils d'audition cumulatifs. Des mesures de dosimétrie croisées avec les données audiométriques auraient peut-être été plus proches de la réalité des expositions. D'ailleurs les auteurs

recommandent de prendre avec précaution la représentativité de leurs estimations d'expositions à des niveaux sonores élevés.

En outre, l'exposition quotidienne au bruit acceptable est décrite en pascal ajusté à l'heure, cette unité de mesure est très peu utilisée. Les auteurs définissent le risque acceptable à 0,10 Pa/ 2H ce qui correspond à une exposition quotidienne en LAeq 8H de 75 dB. Le décibel, unité utilisée habituellement dans la littérature internationale aurait été plus accessible.

#### Les effets des attitudes et des croyances envers le bruit, les pertes auditives et les dispositifs de protections auditives.

**Keppler H, Dhooge I, Vinck B.** Hearing in young adults. The effects of attitudes and beliefs toward noise, hearing loss, and hearing protector devices. Noise Health 2015;17:237-44

#### Résumé

L'exposition volontaire croissante des jeunes à la musique, à niveaux sonores élevés dans les lieux de loisirs (concerts, discothèques, festivals) inquiètent les pouvoirs publics dans la mesure où ces jeunes risquent des dommages auditifs irréversibles.

Les auteurs s'appuient sur le modèle théorique de Widen et al. élaboré pour répondre à la problématique de l'exposition au bruit de loisirs combinant les attitudes, les normes subjectives, le contrôle comportemental perçu, avec des obstacles au changement de comportement. La présente étude évalue l'état de l'audition des jeunes et les liens entre l'audition et ces différentes variables. L'hypothèse est que

les jeunes dont les attitudes et les croyances les amènent à ne pas porter de protections auditives auront une audition plus détérioré que les jeunes qui se protègent.

L'étude comporte différents items sur des échelles de likert (5 points) évaluant les attitudes des jeunes adultes envers l'exposition au bruit de loisirs, leurs croyances relatives à la sensibilité à la perte d'audition, la gravité de la perte, les avantages et les freins à l'utilisation de protections auditives et les normes.

Les résultats montrent une détérioration significative des seuils d'audition en lien avec les scores obtenus pour l'ensemble des items évaluant les attitudes, et les souséchelles associées à la capacité à se concentrer dans des environnements bruyants et l'intention d'influencer l'environnement sonore. Autrement dit, les jeunes qui aiment s'exposer de manière volontaire au bruit ont plus de pertes auditives significatives que ceux qui ont des attitudes neutres ou négatives face au bruit. En outre, les jeunes semblent conscients des difficultés de communication qu'occasionne la perte d'audition. A l'opposé, les obstacles à préventive ainsi que les intentions comportementales sont en moyenne évaluées de façon plus positive.

Etre conscient des conséquences de la perte auditive n'implique pas directement des changements de comportements ou la mise en place de mesures de protection. L'inconfort lié à l'utilisation des protections, la pression perçue au niveau des oreilles et les difficultés à communiquer sont autant de freins perçus à l'intention de se protéger. Cependant les jeunes qui sont plus concernés par leur santé utilisent plus souvent ces protections. La batterie de tests auditifs a permis de montrer qu'il y avait une tendance à l'augmentation des seuils moyens chez les personnes ayant une appétence pour les niveaux sonores élevés. Les résultats ne sont pas cependant significatifs. Les attitudes et croyances concernant le bruit, la perte auditive, et le comportement de protection de jeunes ont un impact significatif sur leur niveau d'audition ainsi que l'utilisation des bouchons d'oreilles.

Les auteurs insistent sur la nécessité de travailler sur l'apparence des protecteurs individuels, le marketing pour inciter les jeunes à se protéger. Les informations sur les symptômes ressentis et liés à l'exposition au bruit des loisirs devraient les aider à mieux comprendre les atteintes auditives tout en fournissant des connaissances sur l'exposition, les pertes auditives et les protections auditives. De même, le modèle de Widen doit permettre aux professionnels de santé de s'emparer de ces résultats pour induire des changements de comportement et de normes sociales. Keppler et al. Concluent à la nécessité de développer les études épidémiologiques chez les jeunes sur la prévalence des pertes auditives et les acouphènes liés à l'exposition au bruit des lieux de loisirs.

#### Commentaire

Les auteurs ont étudié les attitudes et les croyances à l'égard de l'exposition au bruit des loisirs en utilisant un modèle inspiré du « health model belief » en lien avec divers tests audiométriques.

Il est difficile de relier des réponses physiologiques de base, à des attitudes et croyances envers l'exposition au bruit dans les loisirs. Cependant les auteurs arrivent à démontrer que le fait d'avoir une attitude sans méfiance envers le bruit a tendance à accroître les pertes auditives constatées en l'absence de bouchons d'oreilles. Ces résultats vont permettre d'inciter les professionnels de santé à travailler sur les attitudes, les croyances et les normes pour déclencher des changements de comportement.

Cependant ces résultats ne peuvent être généralisés dans la mesure où ils concernaient un échantillon de 127 femmes et de 36 hommes. Un échantillon représentatif des jeunes de 18 à 30 ans permettrait de confirmer ces tendances.

Concernant les tests audiométriques, un travail reste à mener sur la pertinence de ces données pour asseoir ces changements.

#### CONCLUSION GÉNÉRALE

Les auteurs de ces deux articles ont mesuré l'audition de jeunes et tenté de faire le lien avec l'exposition cumulée au bruit au cours de la vie et les éventuelles pertes auditives ou l'audition et les attitudes et les croyances à l'égard du bruit. Ces mesures physiologiques semblent difficiles à corréler avec ce type de variables relevant de l'exposition ou des représentations du bruit. Il ne faudrait pas pour autant conclure à une absence de risques auditifs lors d'expositions répétées à des loisirs bruyants. Les tests audiométriques réalisés ne tiennent pas compte notamment de la compréhension de la parole dans le bruit. En outre il faut peut-être chercher les conséquences de ces expositions chez une population plus âgée car ces dernières ne sont pas toujours immédiates. Les acouphènes et parfois l'hyperacousie ressentis plus précocement que les pertes auditives peuvent conduire plus rapidement à des comportements de protection dans la mesure où ces troubles peuvent être considérés comme des signaux d'alerte. Keppler et al. (2015) montrent que les jeunes qui ne se méfient pas des niveaux sonores élevés ont une audition détériorée et portent moins de bouchons d'oreilles que les autres jeunes. Les campagnes de prévention doivent intégrer les croyances et les attitudes à l'égard du bruit pour promouvoir de réels changements de comportement.

#### **GENERAL CONCLUSION**

The authors of these articles have measured the hearing of young people and tried to make a link between the cumulative noise exposure during life and possible hearing loss or hearing and attitudes and beliefs toward noise. These physiological measures seem difficult to correlate with this type of very subjective variables within the exhibition or beliefs toward noise. Following Williams et al. (2015), it would not take much to conclude an absence of hearing risks on repeated exposure to loud entertainment. Such a conclusion however is not well demonstrated as the authors themselves warn in their article. In addition audiometric tests are only a simple measure of hearing, there are more elaborated tests such as speech understanding in noise, a very sensitive and widespread deficiency associated with hearing loss. Also these studies should perhaps look for the consequences of those exposures in an older population because these consequences are not always immediate. Tinnitus and hyperacusis are often felt earlier that hearing loss. Those symptoms as warning signals can lead more quickly to protective behaviors. Keppler et al. (2015) show that young people who feel positively (without fear) about noise have more deteriorated hearing and wear earplugs less than other youngest. Prevention campaigns should integrate the beliefs and attitudes to promote real change in behavior.

#### Lexique

Echelle de likert: technique de mesure de l'intensité des opinions ou des réactions des individus sur un sujet donné. Elle permet de quantifier des informations d'ordre qualitatif pour aboutir éventuellement à un score. Il en existe de nombreuses variantes. La plus connue et sans doute la plus utilisée, notamment en marketing, est l'échelle de Likert: le répondant exprime son degré d'accord ou de désaccord sur une ou plusieurs propositions.

LAeq: donnée qui caractérise le mieux un bruit fluctuant dans le temps, par exemple le bruit de la circulation automobile. Il s'agit du niveau énergétique moyen pour une période donnée. Le LAeq(6h-22h) ou LAeq jour est le niveau énergétique moyen calculé sur une période de 6h à 22h et le LAeq(22h-6h) ou LAeq nuit est le niveau énergétique moyen calculé sur une période complémentaire de 22h à 6h.

**Health Belief Model** (HBM) : modèle de psychologie servant à expliquer et prédire les comportements en lien avec la santé.

#### Publications de référence

1 Vogel, I., Brug, J., Van der Ploeg, CP., Raat, H.Discotheques and the risk of hearing loss among youth: risky listening behavior and its psychosocial correlates. *Health Educ Res.*: 2010; **25**(5):737-47.

- 2 Gilliver M, Carter L, Macoun D, Rosen J, Williams W. "Music to whose ears? The effect of social norms on young people's risk perceptions of hearing damage resulting from their music listening behavior." Noise Health: 2012; (14):47-51.
- 3 **Meyer-Bisch**. Pratique de la musique acoustique. Guide de prévention du risque auditif. Association Françaises des Orchestres.2007; 46 pages.
- 4 Twardella, D., Perez-Alvarez, C., Steffens, T., Bolte, G., Fromme, H., Verdugo-Raab, U. The prevalence of audiometric notches in adolescents in Germany: The Ohrkanstudy. *Noise Health*: 2013; **15**(67):412-419
- 5 **SCENIHR.** Potential health risks of exposure to noise from personal music players and mobile phones including a music playing function. Brussels: Directorate-General for Health and Consumers; European Commission.2008; 80 p.
- 6 Shargorodsky, J., Curhan, SG., Curhan,GC,. Eavey, R. (2010). Change in Prevalence of Hearing loss in US adolescents. *JAMA*, **304**(7):772-778.

#### Revues de la littérature

- 1 Dehnert K, Raab U, Perez-Alvarez C, Steffens T, Bolte G, Fromme H, Twardella D. Total leisure noise exposure and its association with hearing loss among adolescents. Int J Audiol. 2015;54(10):665-73
- 2 Jensen JB, Lysagh tAC,Liberman MC,Qvortrup K, Stankovic KM. Immediate and delayed cochlear neuropathy after noise exposure inpubescent mice. PlosOne 2015;8:1---17.

#### Autres publications identifiées

**Keppler H, Ingeborg D, Sofie D, Bart V.** The effects of a hearing education program on recreational noise exposure, attitudes and beliefs toward noise, hearing loss, and hearing protector devices in young adults. Noise Health 2015;**17**:253-62

L'efficacité d'un programme de prévention de la surdité chez les 78 jeunes a été évaluée 6 mois après la sensibilisation. Une diminution significative de l'exposition au bruit dans les loisirs a pu être notée entre la 1<sup>ere</sup> et la 2<sup>ème</sup> session. 12 % des participants ont changé leur comportement en portant des protections auditives.

**Keppler H, Dhooge I, Vinck B.** Hearing in young adults. Part II: The effects of recreational noise exposure. Noise Health 2015:**17**:245-52.

Aucune différence significative dans l'audition n'a été trouvée entre les groupes exposés à des niveaux différents dans les loisirs. Une évaluation à long terme de la fonction auditive chez les jeunes est nécessaire pour évaluer la progression possible dans la détérioration causée par l'exposition au bruit de loisirs.

Kliuchko M, Heinonen-Guzejev M, Monacis L, Gold BP, Heikkilä KV, Spinosa V, Tervaniemi M, Brattico E. The association of noise sensitivity with music listening, training, and aptitude. Noise Health 2015;17:350-7

Ces auteurs montrent que la sensibilité au bruit n'est pas fonction de l'expertise musicale (non musiciens, musiciens amateurs et musicien professionnel) mais les personnes sensibles au bruit n'ont que peu d'intérêt pour l'écoute de la musique.

Bockstael A, Keppler H, Botteldooren D. Musician earplugs: Appreciation and protection. Noise Health 2015;17:198-208 Cette étude compare cinq types de protections auditives en discothèque durant des périodes d'écoute de 30 minutes avec un questionnaire sur la qualité du son et l'appréciation générale après chaque session d'écoute. Les oto-émissions acoustiques (EOA) ont été mesurées directement avant et après l'exposition à la musique.

#### Liens d'intérêts :



Connaître, évaluer, protéger

# ulletin -cientifique

Édition scientifique • Bulletin de veille n° 29 • Septembre 2016 Notes d'actualité scientifique

Agents chimiques

# Développement de nouveaux outils de mesure de l'exposition aux pesticides et étude des effets neurotoxiques chez l'enfant

Période : septembre 2015 à décembre 2015

Jean-Christophe GARRIGUES | garrigues@chimie.ups-tlse.fr

CNRS - Laboratoire IMRCP, UMR5623 - Toulouse - France

Mots clés : index géographiques, métabolites, neurotoxicité, pesticides, toxicocinétique

L'utilisation intensive des insecticides non persistants comme les organophosphorés\* (OP), les carbamates, les pyréthrinoïdes, ou les organochlorés (OC) depuis les années 70, a un impact sur la santé humaine. Les enfants et les femmes enceintes vivants dans les zones agricoles traitées sont les plus vulnérables. L'exposition prénatale aux OP a été reliée à de nombreuses atteintes fœtales comme la taille de la boite crânienne ou le poids de naissance diminué et des anomalies du développement du système neurologique du fœtus (1, 2).La mesure de cette exposition, qui est un enjeu majeur de santé publique, est difficile à réaliser de par la nature très variable des pesticides, de leurs propriétés physico-chimiques et des voies multiples de contamination. Pour évaluer cette exposition, différents modèles ont été développés, utilisant des données géographiques ou des mesures toxicocinétiques. Dans les années 2000, l'étude (3) de Lu et al. a montré la présence de taux élevés d'OP et de leurs métabolites, dans les urines d'adultes et d'enfants exposés, avant que le lien entre ces taux élevés et des effets neurologiques, cancérogènes ou immunologiques ne soit établi (4) par Koureas et al. Le choix des biomarqueurs adaptés à la détermination de la dose de pesticide absorbée est difficile du fait de l'élimination des principes actifs en 24 à 72h après le contact (5). Pour les OP, ce sont le plus souvent les métabolites alkylphosphates qui sont analysés par GC-FPD\* (6). Pour les OC, les métabolites sont analysés par GC-ECD\* ou GC-MS\*. Les taux de métabolites ainsi mesurés doivent ensuite être intégrés à des modèles toxicocinétiques, afin de précisément évaluer l'exposition et la relier aux effets observés. Pour pallier à ces voies multiples d'élimination des pesticides par l'organisme, une alternative utilisant des paramètres géographiques (7) a été proposée, dès 2006 par Meyer et al. permettant de mesurer l'exposition, sans avoir recours au dosage des métabolites. La première publication présentée dans cette note montre l'étude menée par Gonzalez-Alzaga et al. (Novembre 2015) combinant l'utilisation d'un modèle géographique et le dosage de métabolites de pesticides pour évaluer l'exposition pré et post natale d'enfants et mesurer les effets neuropsychologiques induits. L'étude menée par Colapinto et al. (Octobre 2015), n'utilise que les dosages sanguins et urinaires des métabolites de pesticides pour évaluer l'effet de la consommation de thé pendant le premier trimestre de grossesse. La troisième publication montre l'étude menée par Galea et al. (Novembre 2015) visant à comparer un modèle d'exposition développé en Grande Bretagne avec un modèle toxicocinétique. Ces 3 études montrent les avancées obtenues dans le développement de modèles d'expositions aux pesticides non persistants. Les effets neurotoxiques de ces molécules sont clairement démontrés et reliés aux différents modèles.

Expositions pré et postnatales aux pesticides et effets sur le développement neuropsychologique des enfants vivant dans les communautés agricoles du Sud-Est de l'Espagne.

González-Alzaga B, Hernández AF, Rodríguez-Barranco M, Gómez I, Aguilar-Garduño C, López-Flores I, Parrón T, Lacasaña M. Pre- and postnatal exposures to pesticides and neurodevelopmental effects in children living in agricultural communities from South-Eastern Spain. *Environ. Int.* 2015;85:229-237.

#### Résumé

Dans cette étude menée en Espagne, les auteurs ont développé une méthodologie pour démontrer le lien entre une exposition pré ou postnatale aux pesticides et des effets préjudiciables au développement neurologique d'enfants de six à onze ans. L'étude a consisté à suivre le taux urinaire de six métabolites dialkylphosphate (DAP) par GC-MS/MS\*: dimethylphosphate (DMP), dimethylthiophosphate (DMTP), dimethyldithiophosphate (DMDTP), diethylphosphate (DEP), diethylthiophosphate (DETP). Les prélèvements ont été réalisés sur 305 enfants, âgés de six à onze ans, à deux périodes de haute ou basse fréquence de pulvérisation de pesticides. Pour déterminer la part de l'influence pré-natale, auteurs définissent des indices d'exposition géographiques (GIS), basés sur les distances du lieu d'habitation de la mère, pendant la grossesse, aux zones de récolte. Les données sont collectées auprès des mères, à partir de questionnaires sociologiques, hygiènes et modes de vie, activités physiques. Différents traitements statistiques sont réalisés (χ², student, Mann-Whitney-Wilcoxon) pour évaluer les différences relatives au sexe ou pour étudier les effets des taux de métabolites. L'indice GIS postnatal est déterminé à partir des informations recueillies pour l'enfant. L'ensemble des paramètres individuels et de la communauté, impliqués dans le calcul des GIS est donné dans la publication. Les GIS affichent un résultat en surface de culture influençant chaque individu par année (ha/an). Chaque enfant est ensuite soumis à une série de tests neuropsychologiques dans quatre domaines : Vocabulaire et compréhension orale, arithmétique, perception et raisonnement, codage. L'effet cognitif des pesticides a été évalué pour les quatre domaines en fonction des taux urinaires des six DAP, au travers d'une étude multivariée. Les résultats obtenus montrent que les garçons passent plus de temps à jouer à l'extérieur que les filles (1,5 vs 1,2 H/jour), sans influence sur le taux de DAP. La moyenne des taux urinaires de DAP est significativement plus élevée dans la période d'utilisation intensive de pesticides (15,7 nmol/L) que dans la période creuse (10,6 nmol/L). Les auteurs ont également montré une relation entre la surface cultivée qui influence chaque enfant durant la dernière année d'exposition et les taux plus élevés de DMP. Concernant l'effet neuropsychologique, l'étude montre l'influence de l'exposition post natale, mais uniquement chez les garçons. Un effet dose dépendant est associé à la mesure du QI total avec une diminution de 2.5 points pour une teneur en DAP augmentée d'une unité logarithmique. Pour la compréhension orale, l'étude montre une diminution de 6.6 points en fonction de l'exposition. Concernant les valeurs d'indice d'exposition pré et post natale, l'essai montre qu'une augmentation de 10ha/an de surface de culture autour du lieu de vie des enfants est significativement associée à une diminution de 4.3 points dans le résultat moyen du test de compréhension orale et 3.9 points pour le test de raisonnement.

#### Commentaire

L'originalité de l'étude se retrouve dans la détermination de l'exposition aux pesticides, réalisée par le dosage des taux de métabolites DAP en période de forte ou faible utilisation et par le calcul d'indices géographiques d'exposition pré et post natale. Les précédentes études associant les taux de pesticides dans les urines d'enfants à des perturbations cognitives n'avaient pas montré d'effet à l'exception de l'étude de 2006 de Grandjean et al. (8). Dans la publication, des effets neuropsychologiques sont mis en évidence, dans le cas d'exposition post natale, comme décrit dans la littérature. Une autre avancée dans l'étude correspond aux différences de performances liées au sexe, causées par l'exposition aux pesticides. Ces différences permettent d'approcher les effets biologiques liés à l'action des pesticides sur le développement du système nerveux. Rauh et al. (9) ont relevé des modifications structurales (frontale et pariétale) du cerveau d'enfants exposés au Chlorpyrifos\*. Cette étude permet également de relier les taux de DAP à un indice d'exposition calculé. Cet indice relie la surface de culture qui influence le lieu de résidence de chaque enfant à l'exposition aux pesticides, montrant le lien direct qui existe entre la surface de récolte et le taux de métabolites d'OP retrouvés dans les urines. Une autre étude menée en 2014 en France (10) par Chevrier et al., a montré la relation entre le taux de métabolites d'herbicides retrouvés chez la femme enceinte et la proximité de zones de culture de maïs. Cette publication montre la complémentarité dans la métrologie

de l'exposition aux pesticides par l'utilisation d'indices géographiques. Ces indices sont en relation directe avec l'effet cumulatif, sur de longues périodes, des pesticides non persistants, alors que le dosage des taux urinaires des métabolites donne une information sur l'exposition immédiate (<72H). Mais ces méthodologies ont des limites. La détermination des taux de DAP n'est pas spécifique d'un pesticide et peut représenter une autre voie de contamination (par exemple alimentaire). La très haute variabilité intra individus doit être prise en compte. Des avancées notables peuvent en revanche être observées en combinant ces méthodes directes et indirectes pour déceler les effets produits par les seuls pesticides ou par les associations avec d'autres composés neurotoxiques (solvants, métaux ...).

# Consommation de thé pendant la grossesse comme prévision de l'exposition aux pesticides et conséquences sur les naissances : l'étude MIREC.

**Colapinto CK, Arbuckle TE, Dubois L, Fraser W.** Tea consumption in pregnancy as a predictor of pesticide exposure and adverse birth outcomes: The MIREC Study. *Environ. Res.* 2015;**142**:77-83.

#### Résumé

L'objectif de cette étude était de déterminer si la consommation de thé pendant le premier trimestre de grossesse est associée à une augmentation de la concentration en pesticides OC et OP, dans le sang et les urines de femmes enceintes Canadiennes. En parallèle, les auteurs ont étudié l'effet de cette consommation sur le déroulement de la grossesse. Les auteurs ont inclu 1898 naissances, avec analyse de différents biomarqueurs. Pour chaque femme, le dosage de 14 métabolites d'OC dans la fraction lipidique du plasma est réalisée, après une étape d'extraction et analyse GC-MS en mode SIM\*. Pour l'urine, le dosage de six métabolites d'OP est réalisé après dérivatisation et extraction, suivies d'une analyse GC-MS/MS en mode MRM\*. Les résultats obtenus montrent que des quantités détectables sont retrouvées dans moins de 50% des échantillons. Pour le trans-nonachlor, la concentration sérique moyenne est de 2.74 ng/g de lipides. Pour les métabolites détectés, la moyenne des concentrations se retrouve à 1.94 ng/g pour l'oxychlordane et 55.8 ng/g pour le p,p'-DDE. Pour cette classe de métabolites de pesticides, aucune différence n'est trouvée entre les consommatrices de thé ou non. Les métabolites des pesticides OP, sont retrouvés à des concentrations détectables dans 2% des échantillons, sans montrer de différence significative entre les consommatrices de thé et les non consommatrices. Les métabolites de dimethylphosphate dimethylthiophosphate (DMTP), dimethyldithiophosphate (DMDTP), diethylphosphate (DEP), diethylthiophosphate (DETP) sont retrouvés aux concentrations moyennes suivantes ( $\mu$ g/L): 3.19 pour le DMP; 3.29 pour le DMTP; 0.48 pour le DMDTP; DEP : 2.46 pour le DEPet 0.67pour le DETP.

#### Commentaire

Le thé est une boisson consommée annuellement à plus de 4 millions de tonnes dans le monde et une étude menée en 2014 (11) par Wang et al. a montré que des insecticides et des fongicides étaient retrouvés à des doses détectables, sur les feuilles et dans l'infusion. Le taux de transfert important, pouvant atteindre 92.4% pour la carbendazime\* a amené les auteurs de la publication à suivre la répartition des pesticides les plus utilisés, dans le sang et les urines de femmes, pendant leur grossesse. Dans cette étude, 21% des femmes étaient des consommatrices de divers types de thé dans le 1<sup>er</sup> trimestre de grossesse et 5% ont consommé plus de 7 tasses par semaine, ce qui est inférieur à la consommation moyenne retrouvée dans la littérature pour le Canada (8.3 tasses par semaine). L'étude n'a relevé aucune différence entre le groupe des consommatrices et des non consommatrices de thé pour le taux sanguin ou urinaire des pesticides et métabolites OC et OP. Les auteurs suggèrent que la faible consommation relevée dans leur étude est liée à cette absence d'influence, attribuée aux quantités de pesticides détectés dans moins de 50% des échantillons. En revanche, l'étude montre que les taux sanguins de certains métabolites (p,p'-DDE) retrouvés sont plus faibles pour la femme enceinte (55.8 ng/g) que ceux retrouvés dans la littérature pour la femme en dehors d'une grossesse 151.04 ng/g). Ces résultats, confirment ceux observés dans la littérature, notamment par Wooddruff (12) et al. suggérant un transfert des pesticides vers le fœtus ou le lait maternel. Ce résultat est une avancée dans le domaine, incitant à poursuivre les études sur l'exposition aux pesticides pendant la grossesse ainsi que les études toxicocinétiques, pour mieux comprendre les mécanismes de diffusion des pesticides et de leurs métabolites chez le fœtus. Cette étude ne démontre aucun effet lié à la consommation régulière <7 tasses par semaine) de thé, sur les taux urinaires et sanguins d'OP et OC.

# Comparaison de l'exposition de résidents aux pesticides avec les prévisions obtenues avec l'exposition issue du cadre réglementaire faite en grande bretagne.

Galea KS, MacCalman L, Jones K, Cocker J, Teedon P, Cherrie JW, Van Tongeren M. Comparison of residents' pesticide exposure with predictions obtained using the UK regulatory exposure assessment approach. *Regul. Toxicol. Pharm.* 2015;73:634-643.

#### Résumé

L'étude a pour objet la validation du modèle d'exposition aux pesticides, utilisé par les autorités de Grande Bretagne, pour garantir la sécurité des personnes vivants à proximité des zones d'utilisation. Un échantillon de 149 personnes (125 adultes et 24 enfants) habitant dans un rayon de 100m autour des zones où des pesticides ont été pulvérisés a été suivi. L'étude a porté sur le dosage urinaire de 5 pesticides : cypermethrine\*, penconazole\*, captane\*, chlorpyrifos et chlormequat\* et de leurs métabolites. Les urines totales d'une journée sont collectées 24h (T24) et 48h (T48) après la pulvérisation, congelées et analysées. Pour tenir compte des

autres voies de contamination, un dosage témoin des urines est réalisé en dehors des périodes de pulvérisation. Pour modéliser l'exposition aux pesticides pulvérisés, les auteurs ont utilisé les données fournies par les agriculteurs: Heure de début et fin de traitement, matière active, formulation et quantité utilisée, méthode de pulvérisation et débit, surface traitée, conditions météorologiques. L'ensemble de ces données est communiqué au Centre de régulation du ministère de la santé de Grande Bretagne, pour la mise en œuvre des calculs du modèle d'exposition (REA). Le modèle REA considère trois voies d'expositions : la première, directe, liée au nuage de pulvérisation permet de prévoir la quantité de matière active déposée sur la peau et inhalée. La seconde, permet de prévoir la quantité de matière active absorbée par inhalation de vapeurs résiduelles et la troisième prévoit la quantité absorbée par contact avec des zones de vie contaminées (jardin, aire de jeu ...). Le résultat fourni par le modèle REA est une concentration en matière active par individu exprimée en µg/kg. Pour relier le taux urinaire des différents biomarqueurs aux doses exprimées par le modèle REA, le modèle toxicocinétique (13) développé par Rigas et al. est appliqué. Pour les 149 individus, un total de 542 informations d'expositions ont été relevées. Les dosages urinaires à T24 montrent que 100% des individus ont un taux inférieur à celui calculé par le modèle REA pour le captane et le penconazole. Pour la cypermethrine, 18% ont un taux mesuré supérieur à la prévision. A T48, 8% des taux de captane, 2% des taux de penconazole et 21% des taux de cypermethrine mesurés sont supérieurs à la prévision. Pour le chlorpyrifos et le chlormequat, environs 40% des taux urinaires sont supérieurs à la prévision du modèle à T24 ou T48.

#### Commentaire

L'étude a démontré la pertinence du modèle d'exposition REA, utilisant des données géographiques et des paramètres liés aux pratiques et aux pesticides utilisés, près des zones d'habitation, pour quantifier l'exposition des résidents. Ces modèles d'exposition sont un très bon complément aux mesures d'exposition directe. Le dosage des taux de métabolites étant difficile à suivre en continu, de par le temps de demi-vie relativement court, pour la plupart des pesticides non persistants actuellement utilisés. Une avancée dans l'utilisation de ces méthodes alternatives au suivi en routine des métabolites correspond à la prise en compte de trois voies d'expositions du modèle REA. En revanche, certains paramètres de l'étude devraient être améliorés : la cypermethrine est le pesticide le moins utilisé dans la période évaluée. Il est alors difficile d'expliquer les taux urinaires supérieurs au modèle qui sont retrouvés dans l'étude. Le modèle REA considère chacun des pesticides comme isolé et ne prend pas en compte l'effet cocktail. Il est alors difficile d'interpréter l'absence d'effet sur les métabolites qui est observé par les auteurs dans le cas d'utilisation conjointe du captane et du penconazole. Des études complémentaires sont à prévoir pour valider le test pour l'ensemble des familles de pesticides utilisés en réévaluant notamment les paramètres du modèle toxicocinétique.

#### **CONCLUSION GÉNÉRALE**

L'exposition aux pesticides pour les personnes résidant à proximité des zones de culture et les personnes vulnérables, est difficile à mesurer, du fait de la diffusion des substances actives et de leur toxicité. Pour évaluer le risque, il est nécessaire de connaître précisément le niveau d'exposition aux substances toxiques et les effets produits. Les trois publications résumées dans cette note montrent les avancées obtenues pour le dosage sanguin et urinaire des métabolites de pesticides non persistants organochlorés (OC) et organophosphorés (OP). Pour ces deux familles de pesticides, la biodégradation est rapide et il est très difficile de précisément quantifier la dose de matière active absorbée et l'effet cumulatif. Les études présentées montrent les avancées obtenues et la pertinence de l'utilisation d'indices d'exposition géographiques (GIS) dans la mesure de l'exposition aux pesticides. L'utilisation de ces indices a permis la détermination de l'exposition pré et postnatale, qui était jusqu'alors difficile à réaliser, directement sur le fœtus, pour les pesticides non persistants. Les auteurs ont également démontré le lien entre une exposition postnatale aux insecticides OP et des neurotoxiques, chez l'enfant. L'utilisation d'indices géographiques est généralisée en Grande-Bretagne, sous la forme d'un modèle d'exposition (REA) qui est évalué dans l'étude de Galea et al. et présenté dans cette note. Ce modèle est une avancée majeure dans la métrologie de l'exposition aux pesticides des riverains des zones de pulvérisation des pesticides. La mise en œuvre de ces indices et de ces modèles permettrait d'améliorer le dispositif règlementaire utilisé en France, comme préconisé dans l'avis de juin 2014 de l'ANSES (14). D'autres indicateurs sont actuellement étudiés, comme ceux de l'étude de Colapinto et al., cherchant à relier la consommation de thé à un facteur de prévision de l'exposition aux pesticides. Les résultats obtenus ne permettent pas d'utiliser cet indicateur dans sa forme actuelle, mais l'étude a montré qu'il était nécessaire de considérer toutes les voies de métabolisation des pesticides, après absorption, notamment chez la femme enceinte. Ces études permettent de comprendre les difficultés rencontrées dans l'évaluation de l'exposition aux pesticides, dans les zones agricoles et le développement d'index géographiques qui ont pour objectif de s'affranchir du dosage sérique ou urinaire des métabolites des matières actives. Le développement de nouveaux index pour évaluer l'exposition offre des outils validés, permettant d'améliorer la protection des personnes exposées aux risques induits par des produits phytosanitaires.

#### **GENERAL CONCLUSION**

The risks for human health, related to the intensive use of pesticides in agriculture, are important for vulnerable people or those living near crop zones. It is necessary to precisely assess the exposure level of toxic substances and the effects, before evaluating this risk. The 3 summarized publications of this note show the advances obtained, for the monitoring of non-persistent organochlorine (OC) and organophosphate (OP) pesticides metabolites, in blood and urine. For these 2 classes of pesticides, the biological metabolism and breakdown is fast and it is difficult to precisely quantify the amount of active compound absorbed as well as the cumulative effect. The presented studies show the advances obtained with the use of indices based on geographical information system (GIS) in the measurement of the exposure rate of pesticides. The use of these indices allowed the determination of the pre and postnatal exposure, which was impossible to discriminate for non-persistent pesticides, with the former methods. The authors also showed a link between a postnatal exposure to OP insecticides and neurotoxic effects, for child. GIS indices are largely used in UK, associated with an exposure model (REA) which is evaluated in the study of Galea et al. presented in this note. This model is a major advance in the metrology of pesticides exposure for residents who live near the pulverization zones of the pesticides. The implementation of these indices and these models would improve the regulatory process used in France, as recommended in the Anses note (14) from June 2014. Other biomarkers are currently evaluated, as presented in the study of Colapinto et al.seeking to connect tea consumption with a pesticide exposure factor. The results obtained do not permit the use this indicator in its current form, but the study show that it is necessary to understand all the metabolic pathways of the pesticides, after absorption, in particular for pregnant women. These studies show the difficulties encountered in the evaluation of pesticides exposure, in crops zones and the development of geographical indices which aim to remove serum or urinary rate analysis of the metabolites. The development of new indices for exposure measurement offers validated tools, for the protection improvement of the exposed people to the induced risks of pesticides.

#### Lexique

**Carbamates** : sels ou aux esters de l'acide carbamique, pour les pesticides ce sont généralement des insecticides ou régulateurs de croissance.

Carbendazime : fongicide de la famille des benzimidazoles.

**Chlormequat** : régulateur de croissance de la famille des ammoniums quaternaires appliqué sur les céréales pour diminuer la longueur des tiges. Publications de référence

Chlorpyrifos: Insecticide organophosphoré.

Cypermethrine: insecticide de la famille des pyréthrinoïdes.

**GC-ECD**: Chromatographie gazeuse couplée à un détecteur à capture d'électrons utilisé pour analyser les composés halogénés.

**GC-FPD**: Chromatographie gazeuse couplée à détecteur à photométrie de flamme utilisé pour analyser les composés contenant du soufre ou du phosphore.

**GC-MS** : Chromatographie gazeuse couplée à un détecteur de spectrométrie de masse.

**GC-MS/MS**: Chromatographie gazeuse couplée à un détecteur de spectrométrie de masse en tandem.

MRM: Multiple reaction monitoring. L'analyseur de masse assure la sélection d'un ion parent, puis après fragmentation, un autre analyseur en tandem assure la détection d'un ion fils sélectionné.

**Organochlorés**: molécules renfermant au moins une liaison carbone-chlore, pour les pesticides ce sont généralement des insecticides ou fongicides.

**Organophosphorés** : molécules ayant une liaison carbonephosphore, pour les pesticides ce sont généralement des insecticides ou herbicide.

**Penconazole**: fongicide de la famille des triazoles. Captane: fongicide de la famille des phtalimides.

**Pyréthrinoïdes**: molécules qui sont des esters de l'acide chrysanthème monocarboxylique, pour les pesticides ce sont généralement des insecticides.

**SIM** : Selected Ion Monitoring. L'analyseur de masse est paramétré pour ne détecter qu'un ion choisi.

**Trans-nonachlor** : isomère *trans* le plus toxique de l'insecticide organochloré Chlordane.

#### Publications de référence

- 1 **Whyatt RM** *et al.* Prenatal Insecticide Exposures and Birth Weight and Length among an Urban Minority Cohort. *Environ Health Perspect* 2004;**112**:1125-1132
- 2 **Eskenazi B et al.** Organophosphate Pesticide Exposure and Attention in Young Mexican-American Children: The CHAMACOS Study. *Environ Health Perspect* 2007;**115**:792-798

- 3 Lu C, Fenske RA, Simcox NJ, Kalman D. Pesticide Exposure of Children in an Agricultural Community: Evidence of Household Proximity to Farmland and Take Home Exposure Pathways. *Environ Res* 2000;**84**:290-302
- 4 Koureas M, Tsakalof A, Tsatsakis A, Hadjichristodoulou A. Systematic review of biomonitoring studies to determine the association between exposure to organophosphorus and pyrethroid insecticides and human health outcomes. *Toxicol Lett* 2012;**210(2)**:155-168
- 5 **Aprea C** *et al.* Biological monitoring of pesticide exposure: a review of analytical methods. *J Chromatogr B* 2002:**769**:191-219
- 6 Aprea C et al. Urinary excretion of alkylphosphates in the general population (Italy). Sci Total Environ 1996;177:37-41
- 7 **Meyer KJ** *et al.* Agricultural pesticide use and hypospadias in eastern Arkansas. *Environ Health Perspect* 2006;**114(10)**:1589-1595
- 8 **Grandjean P, Harari R, Barr DB, Debes F.** Pesticide Exposure and Stunting as Independent Predictors of Neurobehavioral Deficits in Ecuadorian School Children. *Pediatrics* 2006;**117(3)**:546-556
- 9 Rauh VA *et al.* Brain anomalies in children exposed prenatally to a common organophosphate pesticide. *P Nat Acad Sci* 2012;**109(20)**:7871-7876
- 10 **Chevrier C** *et al.* Environmental determinants of the urinary concentrations of herbicides during pregnancy: The PELAGIE mother–child cohort (France). *Environ Int* 2014:**63**:11-18
- 11 Wang J, Cheung W, Leung D. Determination of pesticide residue transfer rates (percent) from dried tea leaves to brewed tea. *J Agric Food Chem* 2014;**62**:966-983
- 12 **Woodruff TJ, Zota AR, Schwartz JM.** Environmental chemicals in pregnant women in the United States: NHANES 2003–2004. *Environ Health Perspect* 2011;**119(6)**:878-885
- 13 **Rigas M, Okino M, Quackenboss J.** Use of a pharmacokinetic model to assess chlorpyrifos exposure and dose in children, based on urinary biomarker measurements. *Toxicol Sci* 2001:**61**:374-381
- 14 **Anses**. AVIS relatif à une demande d'appui scientifique pour réévaluer le dispositif réglementaire destiné à protéger les riverains des zones traitées avec des produits phytosanitaires. PHYTO2013sa0206 juin 2014.

# Revues de la littérature parues dans la période de veille ou l'année

- 1 Yusa V, Millet M, Coscolla C, Roca M. Analytical methods for human biomonitoring of pesticides. A review. *Anal Chim Acta* 2015;**891**:15-31
- 2 Yusa V, Millet M, Coscolla C, Pardo O, Roca M. Occurrence of biomarkers of pesticide exposure in non-invasive human specimens. *Chemosphere* 2015;**139**:91-108

3 **Zhang M, Zeiss MR, Geng S.** Agricultural pesticide use and food safety: California's model. *J Integr Agr* 2015;**14(11)**:2340-2357

## Autres publications identifiées dans la période de veille

- 1 Arshad M, Siddiqa M et al. Biomonitoring of toxic effects of pesticides in occupationally exposed individuals. Saf Health Work 2015; doi:10.1016/j.shaw.2015.11.001.

  La publication présente le suivi par GC-FID de l'effet génotoxique lié à l'exposition au malathion pour des ouvriersde l'industrie chimique au Pakistan. La publication n'est pas retenue car limitée au seul malathion.
- 2 **Bado-Nilles A, Jolly S** *et al.* Involvement of fish immunomarkers in environmental biomonitoring approach: Urban and agri-viticultural context. *Ecotoxicol Environ Saf* 2015;**120**:35-40

La publication présente le développement d'un outil de suivi de l'exposition aux produits chimiques et pesticides, basé sur le dosage des biomarqueurs immunologiques de poissons. La publication n'est pas retenue car non spécifique des pesticides.

3 Jensen BH, Petersen A *et al.* Cumulative dietary exposure of the population of Denmark to pesticides. *Food Chem. Toxicol* 2015;**83**:300-307

La publication présente 3 modèles d'exposition aux pesticides permettant de modéliser l'effet cumulatif lié à la consommation des fruits, légumes et céréales. La publication n'est pas retenue car le modèle d'exposition se limite à l'alimentation et les effets sur la santé ne sont pas pris en compte.

#### Liens d'intérêts :

## Perturbateurs endocriniens, hormones de la reproduction et risque de cancer du sein

Période : septembre 2015 à novembre 2015

Véronique MACHELON | veronique.machelon@gmail.com

CNRS, Chargée de recherche honoraire - 3 Villa de la Reine - Versailles - France

Mots clés: biphényles polychorés, bisphénol A, cancer du sein, endométriose, estrogènes, hormones sexuelles féminines, perturbateurs endocriniens

Actuellement près de 800 molécules présentes dans notre environnement sont identifiées comme des perturbateurs endocriniens (PE)\*. Parmi ces substances, certaines sont susceptibles de modifier la production des hormones de la reproduction et de favoriser chez la femme la survenue de pathologies comme l'endométriose\* et les cancers du sein\* (1, 2), ces dernièrs touchant une femme sur huit dans les pays occidentaux (3). Les études portant sur des populations humaines restent peu nombreuses, d'où ce choix de publications pour cette note. La première étude cible une population chinoise, la seconde reprend un ensemble de données publiées dans les 15 dernières années. La première étude a pour objectif de corréler les concentrations de bisphénol A (BPA)\* mesurées dans les urines à celles d'hormones de la reproduction mesurées dans le sang ; parmi celles-ci la progestérone (P)\*, une hormone qui contrôle la prolifération cellulaire et l'activation des cellules souches dans la glande mammaire adulte, et qui pourrait constituer un facteur cancérigène (4, 5), et la prolactine (PRL)\*, connue pour favoriser le développement des cancers du sein (6). Dans la seconde étude, les auteurs ont mis en place un travail de méta-analyses de façon à cumuler des données provenant de plusieurs études pour rechercher si des substances estrogéniques\* telles que les biphényles polychlorés (PCBs)\*, bisphénols (BPs) et phtalates\* sont susceptibles de cibler des gènes impliqués dans l'endométriose et les cancers du sein.

# Associations entre l'exposition au bisphénol A et les hormones de la reproduction chez des ouvrières chinoises

Miao M, Yuan W, Yang F, Liang H, Zhou Z, Li R, Gao E, Li D-K. Associations between bisphenol A exposure and reproductive hormones among female workers. *Int J Environ Res Public Health* 2015;12:13240-50.

#### Résumé

Il s'agit d'une étude transversale et comparative réalisée sur un groupe de 106 ouvrières chinoises de 18 à 45 ans exposées pendant leur temps de travail à des concentrations élevées de BPA et sur un groupe de 250 ouvrières non exposées. Les taux de BPA dans les urines des femmes exposées sont significativement augmentés par rapport aux femmes non exposées. Chez les femmes les plus exposées au BPA (n=45), le taux sérique d'hormone lutéinisante\* (LH) est diminué et celui de l'estradiol (E2) augmenté. L'analyse par régression linéaire multiple\* sur l'ensemble des femmes (exposées + non exposées) fait apparaître une corrélation significativement positive entre le taux de BPA dans les urines et les taux sériques de prolactine et progestérone.

#### Commentaire

Selon les auteurs, cette étude montrerait pour la première fois que l'exposition à des doses élevées de BPA serait associée à une modification de la production de certaines hormones de la reproduction chez la femme. Ils ont observé des taux sériques de prolactine plus élevés chez les femmes

exposées, de même qu'une augmentation de l'estradiol connu pour augmenter la sécrétion de prolactine. On notera toutefois que cette augmentation de prolactine ne semble pas associée à des troubles du cycle menstruel. Cette étude met aussi en évidence une augmentation du taux de progestérone, mais paradoxalement le taux de LH, qui contrôle directement la production de progestérone par les cellules lutéales, est diminué chez les femmes les plus exposées. Il faut encore souligner que cette étude transversale présente des limites dues en premier lieu à la petite taille des populations prises en compte et à l'absence de conclusion possible en termes de causalité.

#### Identification des liens environnementaux et moléculaires entre l'endométriose et le cancer du sein utilisant les données bioinformatiques et une approche génétique et épidémiologique

Roy D, Morgan M, Yoo C, Deoraj A, Roy S, Yadav VK, Garoub M, Assaggaf, Doke M. Integrated bioinformatics, environmental epidemiologic and genomic approaches to identify environmental and molecular links between endometriosis and breast cancer. *Int J Mol Sci* 2015;**16**: 25285-322.

#### Résumé

En s'appuyant sur un programme bioinformatique de type méta-analyse\*, les auteurs ont regroupé un ensemble de données épidémiologiques et génomiques provenant

d'études publiées depuis 2000. Ils ont confirmé l'activité estrogénique des PCBs, BPs et phtalates, puis ont déterminé quels gènes sont altérés en cas d'exposition à ces trois produits ce qui leur a permis d'établir des liens entre des centaines de gènes impliqués dans les cancers du sein et l'endométriose, et les trois molécules à activité de PEs. A partir de ces données, ils ont identifié cinq gènes -CYP19A\*, EGFR\*, ESR2\*, FOS\*, et IGF1\*- interagissant avec les PCBs, BPs et phtalates. Ces gènes sont régulés par les estrogènes, sont impliqués dans la voie des MAPKs<sup>17</sup>, essentielle pour le contrôle de la prolifération cellulaire, et sont aussi des gènes modifiés dans les tumeurs du sein et dans les cancers de l'utérus, de même que dans les lésions de l'endométriose.

#### Commentaire

L'objectif des auteurs était d'identifier les gènes modifiés suite à une exposition combinée de trois types de PEs parmi les mieux identifiés, PCBs, BPs et phtalates et de déterminer si parmi ces gènes, certains étaient impliqués dans l'endométriose et le cancer du sein chez la femme, deux pathologies qui ont en commun une composante hormonale et inflammatoire. Ils ont pour cela utilisé un protocole basé sur un travail de méta-analyses, déjà utilisé pour ce genre d'études (2, 7), ce qui leur a permis de regrouper des données épidémiologiques et génomiques publiées dans la littérature. Ces techniques, qui combinent les résultats d'une série d'études indépendantes, permettent d'augmenter le nombre de cas étudiés, mais en revanche elles peuvent introduire un biais en concluant moins facilement à une absence de résultats. Ici, les études cas-témoins restent peu nombreuses et surtout il n'y a pas d'études prospectives dont le niveau de preuve est plus élevé et qui permettraient de quantifier plus précisément les niveaux de risque. Par ailleurs, la sélection des études appropriées est un élément décisif et le risque de ne travailler qu'avec des études publiées est d'éliminer des résultats non concluants ou discordants. Les auteurs ont retenu cinq gènes cibles des PEs qui sont également modifiés dans les cancers du sein et l'endométriose. Ces gènes sont impliqués dans la synthèse et les voies de signalisation des estrogènes, ce qui pourrait induire un contexte inflammatoire favorisant le développement des deux pathologies (8). Pour le prouver il reste encore à établir une relation de causalité entre la modification de l'expression de ces gènes et les processus cellulaires conduisant au développement de cellules cancéreuses ou de l'endométriose.

#### **CONCLUSION GÉNÉRALE**

De nombreuses études ont cherché à évaluer les risques sur la santé humaine d'une exposition aux PEs. Elles utilisent le plus souvent des modèles cellulaires et des modèles animaux, et portent plus rarement sur des populations humaines. C'est l'intérêt des deux études présentées ici. Elles concernent trois types de PEs largement répandus dans notre environnement : les PCBs, les BPs et les phthalates. La première étude, bien que transversale et limitée à deux petites populations d'ouvrières chinoises, suggère qu'il pourrait y avoir un lien entre l'exposition à des doses élevées de BPs et l'augmentation de la prolactine, une hormone qui augmente la prolifération des cellules de l'épithélium mammaire (9), et altérée par le BPA comme cela a été montré dans une précédente étude (10). La seconde étude tente, à l'aide d'un travail de méta-analyses, de regrouper les données épidémiologiques et génomiques provenant de différentes études pour rechercher un lien entre des gènes cibles des PCBs, BPs et phthalates et des gènes modifiés dans les cancers du sein et l'endométriose. Cinq gènes ont été retenus. Leur expression est estrogéno-dépendante; elle est modifiée suite à une exposition aux trois PEs; elle est également altérée dans les cancers du sein et les lésions de l'endométriose. Ces données ne permettent pas de conclure que les PEs considérés ici sont susceptibles soit d'augmenter la production de prolactine, soit de favoriser la survenue de cancers du sein et de l'endométriose. Toutefois, elles ciblent des gènes qui pourraient être impliqués dans ces deux pathologies ; mais cela reste bien sûr à prouver par des recherches se basant sur des données de biologie moléculaire et de biologie cellulaire.

#### **GENERAL CONCLUSION**

Many studies have attempted to assess the risks on human health from exposure to endocrine disruptors. In this purpose, cellular models and animal models have been often used, and less often human population. This is the reason why the present studies, both carried on human populations, are of interest. Three types of endocrine disruptors' widespread in our environment, have been considered: PCBs, BPS, and phthalates. The first study, although limited to a small population of Chinese female workers, might suggest that there is a link between high levels of BPA exposure and an increase in prolactine production, an hormone increasing the proliferation of mammary epithelium cells (9) and already shown as disregulated by BPs (10). The second study based on a meta-analysis, combines epidemiological and genomic data from populations of several origins to find a link between target genes of PCBs, BPS, and phthalates and genes modified in breast cancer and endometriosis. These data do not allow concluding that the PEs considered hereby, are capable of increasing production or favoring breast cancers and endometriosis. Nevertheless, they target genes which might be implicated in these two diseases; indeed further research using molecular biology and cellular biology tools are necessary to assess it.

#### Lexique

Biphényles polychorés (PCB): Ce sont des polluants ubiquitaires et persistants (demi-vie comprise entre 94 jours à plus de 1 000 ans selon la molécule), identifiés comme des perturbateurs endocriniens à faible dose. Très liposolubles, ils sont fréquemment trouvés dans les tissus gras chez l'humain (dont le lait maternel). Ils sont classés comme « cancérogènes probables ». L'alimentation est la première source d'exposition aux PCB, surtout via des produits d'origine animale: poisson, viande, œufs, produits laitiers. Fabriquer et utiliser des PCB est interdit en France depuis 1987

**Bisphénols (BP):** Bisphénol A, molécule utilisée comme plastifiant, présente dans les emballages alimentaires et les canettes.

Cancers du sein: Les cancers du sein sont des tumeurs malignes dont les plus fréquents (95 %) sont des adénocarcinomes, qui se développent à partir des cellules épithéliales de la glande mammaire. Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez la femme.

**CYP19A:** Gène de la famille des cytochromes P450, enzymes impliqués dans la synthèse des stéroïdes, en particulier les estrogènes.

**EGFR:** Ce gène code pour le récepteur de l'Epithelium Growth Factor (EGFR) qui appartient à une famille de récepteurs contrôlant des voies de signalisations

intracellulaires qui sont très souvent dérégulées dans les cellules cancéreuses, suite à des mutations ou à une surexpression du gène.

**Endométriose**: L'endométriose est caractérisée par la présence de muqueuse utérine en dehors de la cavité utérine, et causant des douleurs ; cela peut engendrer des problèmes d'infertilité.

ESR2: Gène codant pour le récepteur beta des estrogènes (estrogen receptor 2 (ER-beta)). Le récepteur beta s'oppose aux effets médiés par le récepteur ER-alpha. Il a des effets anti-prolifératifs et c'est un puissant suppresseur de tumeur.

**Estrogènes:** Hormones stéroïdiennes sexuelles essentiellement produites chez la femme par les cellules ovariennes pendant la première phase du cycle menstruel.

FOS: Ce gène code pour facteur de transcription nucléaire dont la principale fonction est l'induction de la transcription du gène. Le gène FOS apparaît parmi les premiers facteurs de transcription lorsque la cellule passe de l'état quiescent G0 à l'état préparatoire à la division cellulaire G1 dans le cycle cellulaire.

*GF1*: Ce gène code pour une protéine, la Gfi-1 (Growth factor independent1), qui contrôle l'expression de protéines impliquées dans le cycle cellulaire. Elle agit par méthylation des gènes (sites CpG) qui est un processus épigénétique dans lequel certaines bases nucléotidiques sont modifiées par l'addition d'un groupement méthyle. Lorsque le promoteur d'un gène est méthylé, le gène en aval est en général réprimé.

Hormone lutéinisante (LH): hormone produite par les cellules gonadotropes du lobe antérieur de l'hypophyse, qui associée à l'hormone folliculo-stimulante (FSH), agit sur la fonction des glandes sexuelles chez la femme et chez l'homme. Chez l'homme, la LH stimule la production de testostérone tandis que chez la femme, elle intervient dans les modifications cycliques de l'ovaire (ex : déclenchement de l'ovulation).

**Kinases**: Les kinases sont des enzymes catalysant les réactions de phosphorylation par l'ajout d'un ion phosphate à une molécule cible. Parmi les kinases, on trouve les Mitogen-activated protein kinases (MAPK) qui sont indispensables à l'induction de la division et la survie cellulaire.

Meta-analyse: Une méta-analyse est une démarche statistique combinant les résultats d'une série d'études indépendantes sur un problème donné. La méta-analyse permet une analyse plus précise des données par l'augmentation du nombre de cas étudiés et de tirer une conclusion globale. Cette démarche est largement utilisée en médecine pour l'interprétation globale d'études cliniques parfois contradictoires. L'odds ratio est une façon de quantifier à quel point la présence ou l'absence de la propriété A est associée à la présence ou l'absence de la propriété B dans une population donnée.

**Perturbateurs endocriniens**: Un perturbateur endocrinien est une substance exogène ou un mélange qui altère la/les fonctions du système endocrinien et, par voie de

conséquence, cause un effet délétère sur la santé d'un individu, sa descendance ou des sous-populations (OMS 2002).

**Phtalates :** Plastifiants et adhésifs largement utilisés dans la fabrication des jouets, des cosmétiques, des produits pharmaceutiques

**Progestérone :** La progestérone est une hormone stéroïdienne sécrétée par les cellules du corps jaune des ovaires sous le contrôle de la luteinizing hormone (LH), hormone hypophysaire produite essentiellement dans la seconde partie du cycle menstruel féminin (phase lutéale) et indispensable au début de la gestation.

**Prolactine**: La prolactine est une hormone peptidique sécrétée par les cellules lactotropes de la partie antérieure (adénohypophyse) de l'hypophyse. La prolactine stimule la croissance des glandes mammaires et la synthèse du lait, elle joue aussi un rôle dans le bon fonctionnement de la libido.

**Régression linéaire multiple :** outil statistique utilisé pour l'étude de données multidimensionnelles

#### Publications de référence

- 1 Calafat AM, Ye X, Wong LY, et al. Exposure of the US population to bisphenol-A and 4-tertiary-octylphenol :2003-2004. Environ Health Perspect 2008; 116 (1):39-44.
- 2 <u>Leng L, Li J, Luo XM</u> *et al.* Polychlorinated biphenyls and breast cancer: A congener-specific meta-analysis. *Environ Int.* 2016, **88**:133-41.
- 3 **Remontet L, Estève J, Bouvier AM, et al.** Cancer incidence and mortality in France over the period 1978-2000. *Revue d'Epidémiologie et de Santé Publique* 2003;**51**:3-30.
- 4 **De Souza V, Schenka AA.** Cancer stem and progenitor-like cells as pharmacological targets in breast cancer treatment. *Breast Cancer [Auckl]* 2015;**9** (Suppl 2):45-55.
- 5 **Brisken C, Hess K, Jeitziner R, et al.** Progesterone and overlooked endocrine pathways in breast cancer pathogenesis. *Endocrinology* 2015;**156** (10):3442-3450.
- 6 Swaminathan G, Varghese B, Fuchs SY. Regulation of prolactin receptor levels and activity in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2008; 1:81–91.
- **7 Peluso ME, Munnia A, Ceppi M.** Bisphenol-A exposures and behavioural aberrations: median and linear spline and meta-regression analyses of 12 toxicity studies in rodents. *Toxicology* 2014; **325**:200-208.
- 8 **Gunter MJ, Wang T, Cushman M, et al.** Circulating Adipokines and Inflammatory Markers and Postmenopausal Breast Cancer Risk. *J Natl Cancer Inst.* 2015; **107**(9)
- 9 Martín-Pérez J, García-Martínez JM, Sánchez-Bailón MP, et al. Role of SRC family kinases in prolactin signaling. Adv Exp Med Biol 2015;846:163-88.
- 10 Mannelli C, Szóstek AZ, Lukasik K et al. Bisphenol A modulates receptivity and secretory function of human

decidual cells: an in vitro study. *Reproduction* 2015;**150**:115-125.

#### Revues de la littérature

- 1 Maqbool F, Mostafalou S, Bahadar H, et al. Review of endcrine disorders associated with environmental toxicants and possible involved mechanisms. Life Sci 2015;
- 2 Sotto AM, Sonnenschein C. DDT, endocrine disruption and breast cancer. *Nat Rev Endocrinol* 2015;11 (9):507-8.
- 3 Magnusson U G, Persson S. Endocrine disruptors in domestic animal reproduction: a clinical issue? *Nat Reprod Dom Anim* 2015;**50** (Suppl. 3):15-19.
- 4 Casati L, Sendra R, Sibilia V, et al. Endocrine disrupters: the new players able to affect the epigenome. Front Cell Dev Biol 2015;3 (37):2-9.

#### Autres publications identifiées

- 1 Ventura C, Nieto MR, Bourguignon N, et al. Pesticide chlorpyrifos acts as an endocrine disruptor in adult rats causing changes in mammary gland and hormonal balance. Nanotechnol J Steroid Biochem Mol Biol 2015;156:1-9. Cette étude concerne le chlorpyrifos qui agit in vitro comme un perturbateur endocrinien et induit la prolifération des cellules du sein en activant le récepteur alpha des estrogènes. En utilisant le rat comme modèle, les auteurs ont observé une hyperplasie et une adénose des glandes mammaires suggérant que ce composé pourrait être un facteur augmentant l'incidence des cancers du sein.
- 2 Li M, Han X, Gao W, et al. Bisphenol AF stimulates transcription and secretion of C-X-C chemokine ligand 12 to promote proliferation of cultured T47D breast cancer cells. Toxicology 2015; doi: 10.1016/j.tox.2015.09.007 Cet article met en lumière les interactions potentielles entre le BPA et une chimiokine, CXCL12, produite par certaines cellules tumorales, qui conduisent à favoriser la prolifération des cellules tumorales selon un processus mettant en jeu les récepteurs alpha de l'estradiol. Cette étude s'appuie sur un
- 3 Bousoumah R, Antignac JP, Camel V, et al. Development of a molecular recognition based approach for multi-residue extraction of estrogenic endocrine disruptors from biological fluids couples to liquid chromatography-tandem mass spectrometry measurement Anal Bioanal Chem 2015;407 (29):8713-23.

modèle cellulaire à l'exclusion de toutes autres données.

- Cet article décrit une nouvelle technique, utilisée pour mesurer le taux de pesticides dans les aliments et qui est ici adaptée à la détection des perturbateurs endocriniens, pouvant être à l'état de traces. Cette technique peut aussi être adaptée à la recherche de perturbateurs endocriniens dans les urines et le sérum.
- 4 In SJ, Kim SH, Go RE, et al. Benzophenone-1 and nonylphenol stimulated MCF-7 breast cancer growth by regulating cell cycle and metastasis-related genes via an

estrogen receptor a-dependent pathway. *J Toxicol Environ Health A* 2015;**78** (8):492-505.

Cet article analyse les effets du benzophenone-1(2,4-dihydroxybenzophenone) et du nonylphenol, deux perturbateurs endocriniens provenant de déchets industriels, sur la prolifération d'une lignée cellulaire de cellules tumorales du sein. Ces deux facteurs contrôleraient à la fois le cycle cellulaire et la capacité des cellules à induire des métastases.

#### Liens d'intérêts :

## Emissions de dioxines et furanes bromés lors de processus thermiques industriels ou naturels

Période : septembre 2015 à décembre 2015

Mireille DEFRANCESCHI | mireille.defranceschi@ecp.fr

Ecole centrale Supélec - SPMS - Châtenay-Malabry - France

Mots clés: dioxines/furanes bromés, dioxines/furanes halogénés mixtes, recyclage matières plastiques, polluants persistants

Avec l'augmentation des déchets d'équipements électriques et électroniques (DEEE) générés par la société moderne, des filières de recyclages se mettent en place. En parallèle des filières dédiées d'autres persistent, dans certains pays en voie de développement en Asie et de plus en plus en Afrique, avec des méthodes de retraitement inappropriées, et rudimentaires (dont la combustion à ciel ouvert). Quel que soit le type de filière, des dioxines et des furanes sont générés, à des niveaux divers, par des mécanismes qui restent encore peu connus. La complexité particulière des filières DEEE est liée à la présence de nombreux retardateurs de flamme et tout particulièrement des retardateurs de flamme bromés, qui sont à l'origine de la formation de dioxines et furanes bromés ou halogénés mixtes (chlorés et bromés).

Les dioxines et les furanes sont des composés organiques halogénés n'ayant pas d'application industrielle et ne sont donc pas fabriqués pour eux-mêmes. Tous ceux retrouvés dans l'environnement sont générés à l'état de traces au cours de processus thermiques industriels ou naturels. Ces processus peuvent être des combustions incomplètes, des pyrolyses de composés organiques ou des évènements naturels comme des éruptions volcaniques ou des feux de forêt. Ils sont le résultat de mécanismes mal connus et peu étudiés, voire ignorés.

La persistance dans l'environnement des dioxines/furanes, en fait des polluants très problématiques (POP\*). La toxicité des dioxines ou furanes bromés et mixtes reste encore largement inconnue. Cependant ils sont considérés comme ayant des persistances dans l'environnement et des toxicités équivalentes à celles des congénères chlorés. Récemment, l'Organisation Mondiale du Commerce a suggéré que soient modifiées les valeurs des facteurs d'équivalence toxiques des dioxines (WHO-TEF\*) (3).

C'est dans ce contexte que cette note analyse trois articles. Le premier a pour objectif d'estimer les quantités de dioxines/furanes bromés ou halogénés mixtes dans les sols de zones proches de recyclages à l'air libre de DEEE au Ghana. Le deuxième examine les mécanismes de formation des dioxines/furanes halogénés mixtes dans toutes les situations de combustion ou de feux (incinération contrôlée, combustion incontrôlée, feu accidentel, etc.). Enfin le dernier est une étude mécanistique de la formation des dioxines/furanes.

## Contamination des sols par les composés apparentés aux dioxines chlorées, bromées ou halogénées mixtes lors de la combustion à ciel ouvert de déchets électroniques à Agbogbloshie (Accra, Ghana)

Nguyen Minh Tue, Akitoshi Goto, Shin Takahashi, Takaaki Itai,Kwadwo Ansong Asante, Tatsuya Kunisue, Shinsuke Tanabe. Release of chlorinated, brominated and mixed halogenated dioxin-related compounds to soils from open burning of e-waste in Agbogbloshie (Accra, Ghana). Journal of Hazardous Materials 302 (2016) 151–157

## Résumé

Cette étude est motivée par l'accroissement attendu des volumes de déchets électroniques importés en Afrique (et plus particulièrement au Ghana et au Nigéria) en vue de leur « recyclage » (principalement par récupération des métaux par combustion à l'air libre), après que des restrictions d'importation vers l'Asie aient été mises en place (1). Elle fait

suite à des études récentes qui indiquent que, lors de la combustion à l'air libre de déchets électroniques, les dioxines sont généralement émises sous forme de mélanges contenant plusieurs types de dioxines et des composés de structure proche de celle des dioxines (" dioxin-like "), chacun ayant un degré de toxicité spécifique (2).

Les auteurs étudient le site ghanéen d'Agbogbloshie, de façon systématique, en analysant plusieurs prélèvements effectués d'une part en zone de combustion à ciel ouvert et d'autre part dans des zones où n'ont pas lieu de combustions. La difficulté principale de l'étude résulte du fait qu'il existe un grand nombre de congénères possibles (4700 dioxines halogénées mixtes sont théoriquement possibles) et qu'aucune documentation précise n'existe. Les auteurs ont mesuré les taux de dix dioxines/furanes chlorés, de dioxines/furanes bromés et les dérivés apparentés chlorés les plus abondants.

Leurs conclusions sont que les sols des zones de combustion présentent des niveaux de contamination d'un ou deux ordres de grandeur plus élevé que ceux des zones sans combustion, qui eux-mêmes ont des niveaux plus élevés de deux ordres de grandeur comparés à ceux des zones hors sites de recyclage.

Ces résultats reposent sur des analyses fines de chromatographie en phase gazeuse à haute résolution, suivie d'une détection par spectrométrie de masse. Mais en parallèle, les auteurs ont mené une analyse de la clarté ou de la noirceur du sol, en utilisant des images satellite de Google Earth. Ils ont pu corréler la noirceur d'un lieu de prélèvement (liée à la présence de fortes quantités de cendres issues de la combustion des matières plastiques) avec les taux de contamination élevée. Ils soulignent cependant les incertitudes inhérentes à leur approche. Cette corrélation est utilisée pour déduire les émissions du site entier sur la base des résultats de leur échantillonnage.

En parallèle, des taux de dioxines/furanes dosés dans le sang de travailleurs sur sites de combustion des déchets électriques ont été comparés à ceux d'un groupe témoin. Ces taux sont significativement plus élevés que ceux du groupe témoin.

L'intérêt de l'étude est qu'elle concerne les retombées sur les sols et qu'elle dose de façon globale les concentrations des composés apparentés aux dioxines, indépendamment de leur toxicité connue ou inconnue.

En conclusion, l'étude suggère de prendre des mesures d'urgence pour préserver l'environnement et la santé publique.

## Commentaire

Cette étude complète les données se rapportant à la formation de dioxines/furanes et de composés apparentés bromés et/ halogénés mixtes dans les procédés de recyclage des DEEE et analyse les dépôts sur les sols pour une nouvelle zone géographique (le Ghana). Très souvent, on considère que ces polluants se retrouvent dans les émissions atmosphériques, ce qui conduit à leur rapide dissémination mais aussi à leur transport sur de longues distances. Il est montré ici qu'une grande partie de ces composés retombe sur place, ce qui conduit à de forts taux de contamination des lieux environnant les sites de « recyclage » par combustion à ciel quivert.

Les tendances observées ne peuvent être comparées aux résultats obtenus en Europe et en Amérique du nord, notamment car les méthodes de recyclage sont totalement différentes, la pratique de la combustion à ciel ouvert y étant prohibée. Dans les incinérateurs, les taux de composés apparentés aux dioxines sont relativement faibles dans les mâchefers, et dans les émissions gazeuses, ils peuvent être limités par des températures de four très élevée puis un refroidissement rapide des fumées, la grande majorité des dioxines formées sont ensuite piégées par des technologies d'abattement appropriées.

La seule comparaison possible peut se faire avec les seuils d'alerte d'Europe ou d'Amérique du Nord, qui sont largement dépassés dans le site de l'étude.

L'intérêt de l'étude est qu'elle pallie le manque de données sur les TEF des divers composés analysés, en se focalisant sur les mesures de concentrations des retombées et non sur leurs toxicités. En effet, bien que la toxicité de certains congénères des dioxines/furanes halogénés mixtes ou bromés soit totalement inconnue, la toxicité des mélanges résultant de l'incinération des matières plastiques est globalement suffisamment bien estimée pour que la connaissance des quantités retrouvées sur les sols soit un bon indicateur de la pollution environnante.

## Retardateurs de flamme bromés et formation de dioxines et de furanes dans les feux et au cours d'une combustion

Mengmei Zhang, Alfons Buekens, Xiaodong Li. Brominated flame retardants and the formation of dioxins and furans in fires and combustion. Journal of Hazardous Materials 304 (2016) 26–39

## Résumé

Cette étude porte sur les mécanismes de formation des dioxines/furanes générés par combustion de matières plastiques contenant des retardateurs de flamme bromés, en se focalisant sur les différentes étapes des processus de combustion et les paramètres opératoires associés. Il ne s'agit pas d'une étude mécanistique mais d'une étude de l'influence de paramètres macroscopiques (conditions opératoires). C'est ainsi qu'une comparaison est faite entre une combustion contrôlée (en incinérateur), une combustion non contrôlée (à ciel ouvert) et une combustion accidentelle (accident domestique ou industriel).

Trois mécanismes sont généralement reconnus (2) pour expliquer la formation de dioxines/furanes dans des conditions de température où les autres molécules organiques sont détruites : la formation à partir de précurseurs, la synthèse dite *de novo* et la destruction incomplète de certaines grosses molécules. L'objet de la présente étude est d'identifier quel mécanisme est prépondérant selon les conditions opératoires de la combustion.

Les conclusions indiquent que pour les combustions contrôlées (cas des incinérateurs) c'est le mécanisme de novo qui est privilégié, alors que dans les combustions non contrôlées les deux autres mécanismes sont les principales causes de formation des dioxines/furanes bromés ou halogénés mixtes. En particulier, les auteurs soulignent le rôle des particules solides présentes dans les émissions gazeuses des feux qui serviraient de support à la recondensation de vapeurs de chlorures et bromures métalliques formés lors de la volatilisation des métaux lourds contenus dans les déchets en combustion.

## Commentaire

Le mode de formation des dioxines/furanes reste malgré de nombreuses études un sujet encore largement débattu. En effet ces composés ont la particularité d'être des composés organiques de grande taille qui, à l'inverse des autres molécules organiques, ne sont pas détruits par élévation de la température, mais sont au contraire formés à des températures de l'ordre de quelques centaines de degrés.

Pour expliquer un tel comportement, de nombreuses études mécanistiques ont été réalisées. Compte-tenu de la grande quantité de paramètres pouvant intervenir, il n'existe toujours pas à l'heure actuelle de mécanisme reconnu de façon définitive. Il s'ensuit une difficulté à déterminer les

conditions optimales pour minimiser les émissions de dioxines/furanes des incinérateurs par exemple.

Pour cela, il y a diverses façons de procéder : soit on considère les conditions opératoires de façon à minimiser la production de dioxines/furanes, soit on considère les mécanismes réactionnels pour essayer d'intervenir sur une des étapes et ré-orienter les réactions.

Dans les publications scientifiques, la seconde approche est la plus souvent suivie (la publication n°3 en est un exemple). Elle présente en effet un intérêt particulier pour des gestionnaires d'incinérateurs par exemple.

L'apport de cet article est de contribuer à l'inventaire des sources de contamination environnementale en cours de développement à l'EPA\* et à l'ONU/UNEP\*, pour les dioxines/furanes bromés ou halogénés mixtes.

## Formation des dibenzo-p-dioxines et dibenzofuranes halogénés mixtes (PXDD/F)

Anam Saeed, Mohammednoor Altarawneh, Bogdan Z. Dlugogorski. Formation of mixed halogenated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans (PXDD/Fs). Chemosphere 137 (2015) 149–156

### Résumé

Cette étude porte sur le mécanisme réactionnel de formation des dibenzo-p-dioxines et dibenzofuranes halogénés mixtes (PXDD/F). Parmi les trois types de mécanismes les plus généralement reconnus (voir publication n°2) expliquant la formation de dioxines/furanes, les auteurs se focalisent sur le mécanisme à base de précurseurs. Ils étudient plus particulièrement deux précurseurs: les radicaux 2-chlorophenoxy et 2-bromophenoxy, radicaux facilement formés dès les premières étapes de la dégradation thermique des matières plastiques.

Il s'agit d'une étude reposant sur les méthodes de modélisation moléculaire utilisant la Théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT\*) avec une fonctionnelle permettant de traiter les effets de température.

Leur étude est comparée à des valeurs expérimentales disponibles dans la littérature et un accord assez satisfaisant est obtenu. Les auteurs revendiquent une précision suffisante pour être en mesure d'évaluer l'importance relative des mécanismes en compétition.

Malgré des erreurs inhérentes à ce genre de modélisation reconnue par les auteurs, l'étude a donné une première indication que la présence de tels radicaux lors d'une combustion est un facteur favorisant la formation des dioxines/furanes bromés ou halogénés mixtes. Cependant les auteurs soulignent que ce mécanisme ne peut à lui seul expliquer la formation des différents congénères mixtes.

Pour améliorer les scénarios de formation des dioxines/furanes halogénés mixtes, les auteurs suggèrent de poursuivre les études avec des précurseurs de nature différente.

## Commentaire

Cet article s'inscrit dans une approche systématique des mécanismes possibles expliquant la formation des dioxines/furanes.

A elle seule l'approche ne pourra pas permettre de comprendre ce qui se passe réellement lors d'une combustion de matières plastiques, tant la complexité des systèmes est grande. Cependant, une telle approche est indispensable. D'une part, elle permet de modéliser des mécanismes souvent difficiles à reproduire au niveau expérimental et, d'autre part, elle permet d'examiner de nombreuses réactions en un temps relativement réduit.

Les limites de l'approche sont liées à la pertinence des paramètres de calcul utilisés dans la définition de la fonctionnelle de densité. Dans le cas présent, l'étude fait suite à de nombreuses autres qui ont validé la fonctionnelle.

On ne peut cependant que conclure (comme les auteurs) en soulignant le besoin de multiplier les études complémentaires pour d'autres radicaux précurseurs, pour d'autres voies réactionnelles afin d'accéder aux vitesses relatives de formations des divers composés apparentés aux dioxines

## **CONCLUSION GÉNÉRALE**

Les dibenzo-p-dioxines et les dibenzofuranes chlorés (PCDD/F) sont connus pour être des Polluants Organiques Persistants (POP) et pour se former de façon spontanée, lors de procédés thermiques. Ils constituent un risque sérieux pour la santé et l'environnement. La formation des dibenzo-p-dioxines et les dibenzofuranes bromés (PBDD/F et PXDD/F) au cours de divers processus thermiques fait toujours l'objet de débats quant à leurs mécanismes de synthèse.

Les chemins réactionnels pour l'obtention de certains congénères de PBDD/F, au cours de différents traitements thermiques ne sont pas tous cohérents, les PBDD/F et les PXDD/F peuvent se former en suivant un mécanisme de novo ou bien à partir de précurseurs.

Une première étude vise à quantifier les PBDD/F et les PXDD/F dans les sols des sites de « recyclage » de déchets électroniques par combustion à ciel ouvert à Accra (Ghana) en mesurant leurs concentrations. Les concentrations obtenues sont de deux ordres de grandeur plus élevées que celles trouvées à Accra, loin des sites de recyclage et bien plus élevées que les seuils d'alerte définis en Europe ou en Amérique du Nord.

Une seconde étude présente les catégories de processus thermiques de traitement des déchets susceptibles de relâcher des PBDD/F et des PXDD/F dans l'environnement. Cette étude suggère que dans les incinérateurs, la formation des PBDD/F obéirait à un mécanisme de novo alors qu'en cas de combustion à ciel ouvert, un mécanisme à partir de précurseurs serait privilégié.

Finalement une étude de modélisation examine certains mécanismes moléculaires permettant de comprendre les chemins de formation possibles des PBDD/F et des PXDD/F pour développer une approche permettant de contrôler les paramètres influençant les schémas réactionnels.

## **GENERAL CONCLUSION**

Polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans (PCDD/F) are well-known as unintentionally generated persistent organic pollutants (POPs), which pose serious health and environmental risks on a global scale. Polybrominated and mixed halogenated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans (PBDD/F and PXDD/F) formation from various industrial thermal processes are still debated as regards their occurrence and mechanisms of synthesis.

Specific isomeric pathways for PBDD/F patterns from various thermal recycling sources are not consistent, PBDD/F or PXDD/F might form by different mechanisms such a de novo mechanism or as precursor mechanisms.

A first study is an approach to quantify the PBDD/F and PXDD/F occurrence in soil close to open burning of electronic wastes sites in Accra, Ghana, by measuring the PBDD/F and PXDD/F concentrations. The concentrations are several orders of magnitude higher than those in places in Accra remote from the recycling site and higher than regulation limits in Europe and North America.

A second study summarizes the main categories of thermal waste processes that might release PBDD/F and PXDD/F into the environment, and suggests that PBDD/F might share a similar de novo mechanism as PCDD/F techniques for incineration plants while a precursor mechanism is most likely to happen in open burning processes.

Finally a modelling study gives an insight into some molecular mechanisms which might help in understanding the possible pathways of formation of PBDD/F and PXDD/F, and develops an approach for monitoring parameters influencing some steps of the reaction schemes.

## Lexique

**DFT:** Density Functional Theory ou Théorie de la Fonctionnelle de la Densité.Méthode de calcul de structures moléculaires et d'énergie reposant sur les opérateurs de chimie quantique.

EPA: United States Environmental Protection Agency

**POP**: Polluant organique persistant

**TEF**: Le système d'Equivalents Toxiques (TEQ) exprime la toxicité relative de chaque espèce comme fraction de la toxicité de la dioxine chlorée la plus toxique. Chaque composé se voit attribuer un Facteur d'Equivalence Toxique (ou TEF pour Toxic Equivalent Factor). Ce coefficient de pondération indique le degré de toxicité par rapport à la dioxine 2,3,7,8- tétra-chlorée, à laquelle une valeur de référence de 1 a été donnée.

**UNEP:** United Nations Environment Programme c Programme des Nations Unies pour l'Environnement **WHO-TEF:** L'Organisation mondiale de la santé (OMS ou WHO en anglais) a suggéré que soient modifiées les valeurs des facteurs d'équivalence toxiques, ce sont les WHO-TEF et WHO-TEO.

Publications de référence

- 1 World Health Organization, Flame Retardants: A General Introduction; Environmental Health Criteria 192, International Programme on Chemical Safety (WHO/IPCS), Geneva, Switzerland, 1998.
- 2 **B.H. Robinson, E-waste**: an assessment of global production and environmental impacts, Sci. Total Environ. 408 (2009) 183–191
- 3 Everaert, K., Baeyens, J., The formation and emission of dioxins in large scale thermal processes. Chemosphere 46, 2002, 439–448

## Revues de la littérature

**Everaert, K., Baeyens, J.**, 2002. The formation and emission of dioxins in large scale thermal processes. Chemosphere 46, 439–448.

**EP, U.N.,** 2005. Standardized Toolkit for Identification and Quantification of Dioxin and Furan Releases. Geneva, Switzerland

## Autres publications identifiées

Marek Roszko, Krystyna Szymczyk, Małgorzata Rzepkowska, Renata Jędrzejczak. Preliminary study on brominated dioxins/furans and hydroxylated/methoxylated PBDEs in Baltic cod (Gadus morhua) liver. Comparison to the levels of analogue chlorinated co-occurring pollutants. Marine Pollution Bulletin 96 (2015) 165–175.

L'analyse de foies de morues de la Baltique a montré des taux de dioxines et de furanes variables qui diffèrent d'autres données de la littérature. Les auteurs en déduisent que la contamination n'est pas issue de source unique mais multiples

Richard J. Wall, Alwyn Fernandes, Martin Rose, David R. Bell, Ian R. Mellor. Characterisation of chlorinated, brominated and mixed halogenated dioxins, furans and biphenyls as potent and as partial agonists of the Aryl hydrocarbon receptor. Environment International 76 (2015) 49–56.

L'étude indique que les dioxines/furanes halogénés mixtes se lient aux AhR avec des effets antagonistes variables selon le congénère étudié. Cet effet antagoniste peut être de plus ou moins important que celui du congénère chloré correspondant. Ce point cependant reste à approfondir pour les analyses de risque.

**Xiuning Hua, Wei Wang**. Journal of Environmental Sciences. Chemical looping combustion: A new low-dioxin energy conversion technology. (2015) 135-145.

La technique de combustion chimique, éventuellement prolongée en boucle chimique (ou CLC : **Chemical Looping Combustion**) est étudiée comme alternative à la traditionnelle incinération des déchets solides pour réduire la production de dioxines.

## Liens d'intérêts :

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt

# Etude de mélanges de polluants d'origine chimique : quoi de nouveau sur les mécanismes impliquant des récepteurs nucléaires

Période: septembre 2015 à décembre 2015

Martine PERROT-APPLANAT | martine.applanat@inserm.fr

Inserm U965 - Paris - France

Mots clés: AhR, RE, PXR, hydrocarbures halogénés aromatiques ou HAH, mélanges, perturbateur endocrinien, pesticide organochloré persistant, trans-nonachlor (TNC), 3-MC (3-methylcholanthrene), 17α-éthynyl estradiol

Nous sommes quotidiennement exposés à de multiples composés, polluants environnementaux, substances provenant de l'alimentation, médicaments... Parmi ces composés, il y a les perturbateurs endocriniens (PE\*) qui sont fortement suspectés d'interagir avec des récepteurs nucléaires présents dans nos cellules et d'induire de nombreux troubles physiopathologiques (cancer, obésité, diabète, etc....). Un nombre croissant d'études indique que l'évaluation du risque chez l'humain fondée sur l'exposition à une seule molécule, et donc prise de façon isolée, sous-estime le risque d'effets adverses des composés chimiques (1). L'évaluation des effets des mélanges est rendue difficile par l'existence d'un très grand nombre de polluants et de leurs combinaisons potentielles (2), mais aussi par le manque de connaissance des mécanismes moléculaires impliqués. Depuis quelques années, les données de la littérature suggèrent des effets adverses induits par l'exposition environnementale aux mélanges de PE (même famille, familles différentes de PE agissant via des mécanismes différents...).

Les deux études proposées fournissent des explications mécanistiques et une preuve de concept pour des actions antagonistes via l'interrelation de deux récepteurs différents, AhR (aryl hydrocarbon receptor) et RE $\alpha$ , ou des actions synergiques de deux composés via leur interaction simultanée avec un même récepteur (PXR).

Le premier article analyse les effets combinés d'un ligand d'AhR, le 3-methylcholanthrene (3-MC, appartenant à la famille des hydrocarbures polyaromatiques halogénés ou HAPs) et  $du17\beta$ -estradiol (E\*) sur la glande mammaire du rongeur *in vivo*. Le deuxième article analyse les effets *in vitro* du mélange d'un estrogène présent dans des pilules contraceptives, le  $17\alpha$ -éthynyl estradiol, et d'un pesticide organochloré persistant, le trans-nonachlor (TNC). Si les effets de chacun de ces composés pris isolément montrent une faible efficacité vis-à-vis du récepteur PXR, en mélange ils ont une action synergique vis-à-vis de ce récepteur.

## Interrelations au sein de la glande mammaire chez le rat femelle: rôle du récepteur AhR sur la signalisation oestrogénique

Helle J, Bader MI, Keiler AM, Zierau O, Vollmer G, Chittur SV, Tenniswood M, Kretzschmar G. "Cross-talk in the female rat mammary gland: influence of Aryl hydrocarbonreceptor on estrogen receptor signaling" *Env Health Perspect*, septembre 2015

## Résumé

Le récepteur de la dioxine (AhR), dont le ligand naturel n'est pas identifié, fixe de nombreux ligands d'origine industrielle, alimentaire et médicamenteuse. Parmi ces ligands environnementaux, les mieux caractérisés sont les hydrocarbures aromatiques halogénés (HAH) et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Le récepteur AhR est impliqué dans le métabolisme des xénobiotiques et il contribue aux effets toxiques des dioxines. Cependant, des travaux plus récents ont montré l'importance de ce récepteur dans différents processus physiopathologiques, parmi lesquels la régulation de la

prolifération cellulaire, la tumorigénèse, l'inflammation et le système immunitaire.

L'article de Helle et al. utilise une approche in vivo, pour analyser les effets combinés d'un ligand de AhR appartenant à la famille des HAH, le 3-methylcholanthrene (3-MC) et du 17β estradiol (E2) sur la glande mammaire du rongeur. Dans cette étude, des jeunes rats femelles Lewis ont été nourries avec un régime dépourvu en phytoestrogènes. Les rates ont été ovariectomisées à dix semaines et, 14 jours après, ont été exposées pendant trois jours au 17βoestradiol (E2, 4 μg/kg/j), au 3-methylcholanthrene (3-MC, 15 mg/kg/j) ou à la combinaison E2+3-MC. Deux autres expositions au 8prenylnaringenin (8-PN, autre ligand du récepteur aux estrogènes (REα), 15 mg/kg/j) et au mélange 8-PN+3-MC ont été parallèlement effectuées. Les paramètres suivants ont été analysés: étude en glande étalée ('Whole Mount', n=6-13 rats/groupe), étude de l'expression génique par analyse en microarray (n=3 rats/groupe) et qPCR (n=5-6 rats /groupe), suivie d'études de l'expression des récepteurs (REα, AhR) et des voies de signalisation (en particulier l'interaction AhR- $RE\alpha$ ).

L'exposition à l'œstradiol des rates ovariectomisées (sans cycle oestral) augmente le développement de la glande mammaire (augmentation du nombre de bourgeons alvéolaires terminaux, TEBs). L'oestradiol augmente la prolifération, l'expression des récepteurs à l'oestradiol et à la progestérone dans l'épithélium canalaire, ainsi que l'expression d'un grand nombre de gènes (supérieur à 1.5 fois). Le 3-MC a peu d'effet sur l'expression des gènes, en dehors d'un effet inhibiteur sur l'expression de RE $\alpha$  par rapport aux rats contrôles (non exposés). Cependant, en situation de mélange avec E2, le 3-MC inhibe significativement le développement des TEBs induits par E2, et il diminue de près de la moitié, l'expression des gènes induit par E2. L'expression d'AhR n'est pas modifiée en présence d'E2 ou de 3-MC isolément, ou en situation de mélange. L'effet anti-œstrogénique du 3-MC est due en partie à la diminution de l'expression du récepteur  $RE\alpha$  dans les cellules épithéliales des canaux mammaires. Un effet similaire du 3-MC est observé en présence de 8-PN, autre ligand de RE. De plus, l'étude du transcriptome met en évidence les propriétés anti-œstrogéniques du 3-MC, sur le développement de la glande mammaire et l'expression de gènes et voies de signalisation mises en jeu par  $RE\alpha$  dans la glande mammaire.

## Commentaire

Très peu d'études ont analysé les interrelations des xénobiotiques avec le système hormonal de la glande mammaire au regard du risque de cancer du sein (3-6). La voie la plus classique de la perturbation endocrine dans la glande mammaire est la liaison et l'activation par des molécules environnementales des récepteurs œstrogènes  $\alpha$  et  $\beta$  (RE  $\alpha$  et  $\beta$ ). L'interaction des oestrogènes naturels (œstradiol, œstrone, œstriol) avec les récepteurs RE module l'expression de leurs gènes cibles. Quelques études ont rapporté les conséquences d'une activation du récepteur AhR dans la glande mammaire. Les travaux de quelques groupes de recherche [parmi lesquels ceux de Ohtake 7] ont montré que, in vitro, les récepteurs AhR et REα interagissent entre eux et forment un complexe ternaire avec l'ARNt (AHR nuclear translocator (ARNT) (partenaire de AhR).

Cette étude *in vivo* analyse dans un modèle rongeur les effets et les mécanismes par lesquels des xenobiotiques ligands d'AhR peuvent diminuer les effets de l'œstradiol (ou d'un agoniste naturel) sur le développement de la glande mammaire et l'expression des gènes induits par l'oestradiol. Ce projet est original. L'analyse expérimentale est bien conduite à l'aide d'approche variées et complémentaires, physiologique, cellulaire et moléculaire. La dose choisie de 15 mg/kg/j du 3-MC tient compte du fait que le 3-MC est 10-100 fois moins actif que la dioxine sur l'augmentation de l'expression de Cyp1A1, gène cible d'AhR impliqué dans la détoxification des xénobiotiques. L'article présente une Introduction et Discussion bien argumentées, avec des références bien choisies.

Les conclusions montrent que, in vivo, les récepteurs AhR et  $RE\alpha$  interagissent entre eux et modulent la transcription de gènes œstrogéno-régulés (PR et Wap, en particulier, et gènes impliqués dans la prolifération). Ces résultats pourraient rendre compte des interférences transcriptionnelles

préalablement observées in vitro (7); le complexe  $RE\alpha$ -AhR peut se fixer sur les promoteurs de gènes contenant des ERE ; l'interaction entre  $RE\alpha$  et AhR dépend de la présence du ligand de AhR. Par contre, en présence d'œstradiol, les ligands d'AhR diminuent la réponse induite par E2. Cet effet anti-œstrogénique pourrait être dû à la dégradation accrue de  $RE\alpha$  par le protéasome par rapport au traitement par un seul des ligands.

L'initiation et la progression des cancers du sein impliquent des interactions complexes entre facteurs génétiques et environnementaux, et les oestrogènes jouent un rôle crucial. On ne peut à l'heure actuelle transposer en l'état ces données à l'humain, pour les raisons suivantes : différences possibles liées à l'espèce, la souche de rat, la fenêtre d'exposition. a) les données épidémiologiques et des données in vitro montrent que l'humain est moins sensible que la plupart des espèces à la toxicité liée à la dioxine, le prototype des ligands de AhR appartenant à la sous famille des hydrocarbures HAH. La souche de rat Lewis n'est pas la plus fréquemment utilisée dans les études d'impact des perturbateurs endocriniens sur la glande mammaire (rats Sprague Dawley ou Fisher). b) la fenêtre d'exposition choisie concerne des rates adultes ovariectomisées et exposées pendant 3 jours; elle s'affranchit donc de présence d'un cycle œstral (physiologique), ce qui aurait nécessité l'analyse d'un grand nombre d'animaux. Les résultats ne peuvent ainsi être extrapolés à ceux d'une exposition in utero +/- lactation (période connue pour être particulièrement sensible aux effets des polluants chimiques en général, et particulièrement pour la glande mammaire).

Des études précédentes ont montré que des effets adverses peuvent être induits au niveau de la glande mammaire par l'exposition environnementale à des mélanges PE, pouvant conduire à une susceptibilité modifiée à un cancer hormono-dépendant (3-6). L'interaction des récepteurs nucléaires, tels RE $\alpha$  et AhR mise en évidence dans cette étude, est aussi à prendre en considération pour l'analyse des tumeurs hormono-dépendantes.

## Actions synergiques sur le récepteur humain PXR d'un cocktail binaire de composés pharmaceutiques et environnementaux.

Delfosse V, Dendele B, Huet T, Grimaldi M, Boulahtouf A, Gerbal-Chaloin S, Beucher B, Roecklin D, Muller C, Rahmani R, Cavaillès V, Daujat-Chavanieu M, Vivat V, Pascussi JM, Balaguer P, Bourguet W. Synergistic activation of human pregnane X receptor by binary cocktails of pharmaceutical and environmental compounds. *Nature Communications* 2015, sept 2015

## Résumé

Le deuxième article explore l'exposition de mélanges de composés chimiques, et en détermine les mécanismes, en se focalisant sur le xénorécepteur PXR (pregnane X récepteur). Le récepteur PXR est un récepteur clé dans la défense de l'organisme contre des molécules étrangères. De ce fait, il régule l'expression des enzymes de la famille CYP2B et CYP3A (phase I), ainsi que des enzymes impliqués dans la conjugaison (phase II) et le transport des métabolites de ces

hormones (phase III). Il est reconnu par un nombre croissant de molécules environnementales.

Ce récepteur, une fois activé par un ligand, forme un hétérodimère avec le récepteur de l'acide rétinoique (RXR) et se lie sur des éléments de réponse dans la région promotrice de gènes cibles. L'activation par des xénobiotiques (par exemple des alkylphénols, des pesticides organophosphates) induit la liaison de co-activateurs tels que SRC-1 et régule la transcription de gènes de détoxification, tels que le cytochrome P450 CYP3A4 impliqué dans le métabolisme de plus de la moitié des drogues utilisés en clinique.

Dans cet article, les auteurs démontrent que l'association in vitro de l'ethynyloestradiol [EE2, un estrogène qui rentre dans la composition des pilules contraceptives], et du transnonachlor [TNC, un insecticide organochloré persistant reconnu comme perturbateur endocrinien], bien que faiblement actifs par eux-mêmes, ont la capacité de se fixer simultanément au récepteur PXR situé dans le noyau des cellules et de l'activer. Dans une première étape, les auteurs conduisent une série d'analyses dans des lignées cancéreuses humaines ayant intégré la luciférase sous le contrôle du récepteur PXR, et précédemment décrites (8). L'exposition de ces lignées à l'ethynyloestradiol et le transnonachlor montre que séparément EE2 et TNC se lient seulement à forte concentration à PXR. Mais ensemble, ils y parviennent à des doses très faibles, auxquelles chaque composé est inactif individuellement. Des 'effets cocktail' similaires sont obtenus sur des lignées cancéreuses HepG2 (foie) et LS174T (colon), ainsi que des hépatocytes en cultures, sur l'expression du CYP3A4. Des analyses approfondies utilisant la spectrométrie de masse, des expériences de compétition et la cristallographie montrent qu'EE2 et TNC sont capables de se fixer séparément sur PXR (domaine de liaison LBD) et que le mélange binaire se fixe de manière coopérative sur PXR conduisant à une augmentation de l'affinité de liaison pour le récepteur.

## Commentaire

Dans cet article publié dans *Nature Communications*, les auteurs présentent un mécanisme moléculaire qui participe à l'effet cocktail de molécules chimiques qui prises isolément, sont sans danger, mais peuvent devenir nocives lorsqu'elles sont mélangées. Le récepteur PXR est impliqué dans la détoxification cellulaire, c'est-à-dire l'élimination de l'organisme de toutes sortes de molécules venant de l'extérieur. Séparément l'ethynyloestradiol et l'insecticide trans-nonachlor [TNC] se lient à forte concentration au récepteur PXR. Ensemble, ces molécules se lient à PXR à des doses très faibles (auxquelles chaque composé est inactif individuellement), et cet effet synergique constitue une vraie perturbation endocrinienne pour l'organisme. Cet effet synergique n'a pas encore été analysé à ce jour dans des études in vivo chez la souris.

Cette stratégie permet de tester l'interférence de nombreuses molécules chimiques (pesticides [9], médicaments). Cependant, les auteurs soulignent que le travail est énorme, 'puisqu'il existe dans notre environnement quelque 150 000 composés dont l'action combinée pourrait avoir des effets inattendus sur la santé

humaine au regard de leur innocuité reconnue ou supposée en tant que substances isolées'. Les auteurs indiquent que certaines interactions médicamenteuses pourraient être causées par le même mécanisme.

## **CONCLUSION GÉNÉRALE**

Le développement des connaissances et des méthodes en biologie, génomique, toxicologie, épidémiologie ont permis des avancées considérables dans la caractérisation des dangers et des expositions aux divers agents chimiques et biologiques. Depuis quelques années, les données de la littérature suggèrent des effets adverses induits par l'exposition environnementale à des mélanges de perturbateurs endocriniens. Cependant, l'évaluation des effets des mélanges est rendue difficile par l'existence d'un très grand nombre de polluants et de leurs combinaisons potentielles, mais aussi par le manque de connaissance des mécanismes moléculaires impliqués.

Les deux articles présentés constituent deux exemples d'étude de mélanges à l'aide d'approches originales, in vitro et in vivo. Les données de la littérature suggèrent des effets adverses induits par l'exposition environnementale à des mélanges de PE sur le développement mammaire ou une susceptibilité accrue au cancer, notamment à des cancers hormono-dépendants (10). Les données restent encore peu nombreuses, mais certains mécanismes (en particulier des interactions entre récepteurs nucléaires, des mécanismes épigénétiques [cf BVS n°25],...) commencent à être appréhendés.

## **G**ENERAL CONCLUSION

The development of knowledge as well as novel methods in biology, genomics, toxicology and epidemiology led to considerable progress in characterization of dangers, as well as characterization of exposure to various chemical and biological compounds. The literature survey indicates, since recent years, the adverse environmental effects due to the complex mixtures of endocrine disruptors. Nevertheless, the evaluation of the effects of these mixtures is rendered difficult on account of a large number of pollutants and their potential combination, but also on account of the lacunae of knowledge of molecular mechanisms involved.

The two articles presented represent 2 examples of studies concerning mixtures of endocrine disruptors with the help of original approaches, both in vivo and in vitro. Recent literature underlines adverse effects of EDC mixtures on mammary gland development and cancers, notably hormonal-dependent breast cancer (10). Data is as yet sparse, but certain mechanisms (particularly interrelation between nuclear receptors, epigenetic mechanisms ...) are beginning to emerge.

## Lexique

Perturbateur endocrinien: Un perturbateur endocrinien est une substance exogène ou un mélange qui altère la/les fonctions du système endocrinien et, par voie de conséquence, cause un effet délétère sur la santé d'un individu, sa descendance ou des sous-populations (OMS 2002).

## Publications de référence

- 1 **Kortenkamp A**. Low doses mixture effects of endocrine disruptors and their implications for regulatory thresholds in chemical risk assessment. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2014; 19C, 105-111.
- 2 **Chemical mixtures**: Challenges for research and risk assessment ANSES. Conference 10-11 décembre 2013
- 3 Foster WG, Younglai EV, Boutross-Tadross O, Hughes CL, Wade MG. Mammary gland morphology in Sprague-Dawley rats following treatment with an organochlorine mixture in utero and neonatal genistein. *Toxicol Sci.* 2004;77(1):91-100.
- 4 Boberg J, Mandrup KR, Jacobsen PR, Isling LK, Hadrup N, Berthelsen L, Elleby A, Kiersgaard M, Vinggaard AM, Hass U, Nellemann C.Endocrine disrupting effects in rats perinatally exposed to a dietary relevant mixture of phytoestrogens. *ReprodToxicol*. 2013;40:41-51.
- 5 El Sheikh Saad H, Toullec A, Vacher S, Pocard M, Bieche I, Perrot-Applanat M. In utero and lactational exposure to vinclozolin and genistein induces genomic changes in the rat mammary gland. J Endocrinol. 2013; 216(2):245-63.

- 7 Ohtake F, Takeyama K, Matsumoto T, Kitagawa H, Yamamoto Y, Nohara K, Tohyama C, KrustA, Mimura J, Chambon P, Yanagisawa J, Fujii-Kuriyama Y, Kato S.Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor.Nature 2003;423: 545-50
- 8 Grimaldi M, Boulahtouf A, Delfosse V, Thouennon E, Bourguet W, Balaguer P.Reporter Cell Lines for the Characterization of the Interactions between Human Nuclear Receptors and Endocrine Disruptors. Front Endocrinol (Lausanne). 2015; 11;6:62.
- 9 de Sousa G, Nawaz A, Cravedi JP, Rahmani RA. Concentration addition model to assess activation of the pregnane X receptor (PXR) by pesticide mixtures found in the French diet. *ToxicolSci.* 2014 Sep;141(1):234-43.

### Revues de la littérature

**Cookman CJ, Belcher SM.** Classical nuclear hormone receptor activity as a mediator of complex concentration response relationships for endocrine active compounds. *Curr Opin Pharmacol.* 2014 Dec;19:112-9.

Yang O, Kim HL, Weon J, Seo YR. Endocrine-disrupting Chemicals: Review of Toxicological Mechanisms Using Molecular Pathway Analysis J Cancer Prev 2015, vol 20:12-24 (revue)

## Autres publications identifiées

6 Phrakonkham P, Brouland JP, Saad Hel S, Bergès R, Pimpie C, Pocard M, Canivenc-LavierMC, Perrot-Applanat M. Dietary exposure in utero and during lactation to a mixture of genistein and an anti-androgen fungicide in a rat mammary carcinogenesis model. Reprod Toxicol. 2015:54:101-9.

Cette étude montre que l'exposition in utero et pendant la lactation de rates Wistar à deux perturbateurs endocriniens aux propriétés distinctes : la génistéine [phytoestrogène d'affinité majeure pour le récepteur ERa] et la vinclozoline [un pesticide ayant des effets estrogéniques et antiandrogéniques], utilisés à faibles doses, altère le développement de la glande mammaire chez les animaux pubères, ainsi que chez les animaux cyclés (tels que le développement de structures alvéolaires sécrétrices caractéristiques de la lactation) ; les altérations moléculaires sont compatibles avec les modifications histologiques. De façon inattendue, les conséquences d'une exposition de ce mélange dans un modèle de carcinogénèse induite apparaissent plus sévères, croissance tumorale augmentée, comparées à celles observées avec les molécules isolées.

## Liens d'intérêts :

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt

# Nouvelles méthodes biologiques de détoxification de produits céréaliers contaminés par des mycotoxines

Période : juin 2015 à novembre 2015

## Annie PFOHL-LESZKOWICZ | leszkowicz@ensat.fr

Université de Toulouse, UMR CNRS/INPT/UPS 5503 - Laboratoire de génie chimique, département bioprocédés et systèmes microbiens, UMR CNRS 5503 – Ecole nationale supérieure agronomique de Toulouse ; avenue Agrobiopole - France

Mots clés : aflatoxine, aspergillus, biocontrôle, céréale glucosinolate, isothiocyanate, mycotoxine, moisissure, patuline, penicillium

Les mycotoxines sont des contaminants naturels de l'alimentation. Ce sont des métabolites secondaires secrétés par des moisissures appartenant essentiellement aux genres Aspergillus, Penicillium et Fusarium. Ces contaminants ubiquitaires de l'alimentation humaine et animale contaminent les denrées alimentaires aux champs ou durant leur stockage. Les mycotoxines sont très résistantes aux procédés utilisés en agroalimentaire. Elles se retrouvent principalement dans les céréales et les produits dérivés. L'ingestion de mycotoxines pose de réels problèmes de santé dans les élevages (baisse de la reproduction, immunotoxicité), mais également chez les humains (immunotoxicité, cancer). Les fongicides limitent les contaminations en moisissures au cours des cultures aux champs mais ne permettent pas d'éliminer totalement tous les risques liés aux mycotoxines. De plus, ils présentent par eux-mêmes une certaine toxicité. La tendance actuelle est de développer des méthodes alternatives à l'utilisation de fongicides. Les solutions proposées dans les articles font appel à trois stratégies différentes pour lutter en amont contre le développement de la moisissure et la production de la toxine correspondante. Dans le premier article, le but est de maîtriser la contamination de patuline dans les pâtes à base de blé par l'utilisation de glucosinolates volatils dans les emballages. Dans le deuxième article, les auteurs décrivent l'efficacité de l'hydroxytoluène butylé (BHT) combiné à un insecticide naturel (Purpureocillium) pour réduire l'aflatoxine dans le maïs lors du stockage. Le troisième article préconise l'utilisation de poudre de feuilles de margousier et d'acacia pour limiter le développement des aflatoxines dans le blé, le riz et le maïs.

## Composés bioactifs provenant de farine de moutarde pour le contrôle de la patuline dans des tortillas à base de blé

Saladino F, Manyes L, Luciano FB, Manes J, Fernandez-Franzon M, Meca G. Bioactive compounds from mustard flours for the control of patuline production in wheat tortillas. *Food Science and technology* 2016;66: 101-104.

## Résumé

La patuline est une mycotoxine produite par Penicillium expansum. Elle contamine les fruits mais également les céréales. Son ingestion peut conduire à une perturbation des fonctions intestinales. Deux moutardes contenant des glucosinolates\* ont été testées pour limiter la production de patuline. D'une part, la moutarde orientale contenant essentiellement de la sinigrine et, d'autre part, la moutarde jaune contenant de la sinalbine\*, ont été utilisées. En présence d'eau et sous l'action de la myrosinase\*, ces glucosinolates sont convertis en isothiocyanates volatils. L'efficacité des glucosinolates a été testée dans l'emballage des tortillas à base de blé sur la production de patuline produite par P. expansum. Les tortillas (10g) ont été emballées dans des sachets en plastique contenant des quantités croissantes (0,5 à 2g) soit de farine de moutarde orientale, soit de farine de moutarde jaune en présence de la même quantité d'eau pour amorcer la libération de l'isothiocyanate. Des tortillas ont aussi été emballées avec de l'isothiocyanate d'allyle\* déposé sur un papier filtre. Ces tortillas sont restées pendant 30 jours à 23°C. La concentration d'isothiocyanate d'allyle dans le sac est deux fois plus importante après 48h d'incubation en présence de l'isothiocyanate déposé sur papier filtre qu'en présence de farine de moutarde orientale. Seule la production de patuline a été mesurée. La diminution de la production de patuline atteint 99,1% avec 2g de moutarde jaune et 92,8% avec la moutarde orientale. Cette diminution est comparable à celle obtenue avec l'isothiocyanate d'allyle. L'activité antifongique, reflétée par la mesure de la production de patuline est stable au moins deux mois.

## Commentaire

L'utilisation de ce type de composés bioactifs provenant de moutarde pourrait constituer un moyen efficace de conservation de produits alimentaires à base de céréales susceptibles d'être contaminés par de la patuline. L'utilisation de farine de moutarde est particulièrement intéressante puisque les isothiocyanates ne sont générés qu'en présence d'eau. Il n'y a donc pas de perte prématurée de l'activité des glucosinolates dans la poudre sèche qui est ajouté telle quelle dans l'emballage des tortillas en présence d'eau. Les auteurs mentionnent l'inhibition de la croissance de *Penicillium expansum* sans donner les valeurs, ce qui rend difficile la quantification de l'effet fongicide. Il n'y a pas

nécessairement de corrélation directe entre l'inhibition de la croissance du champignon et la production de la toxine. L'article ne prend pas en compte l'effet toxique potentiel des isothiocyanates, ni l'impact sur la qualité des tortillas. Il faudrait compléter l'étude pour savoir si les quantités de moutarde ne sont pas trop importantes compte tenu de leur potentiel toxique, d'autant qu'il semblerait que le taux d'isothiocyanates ne soit pas directement corrélé à la diminution de la production de patuline. Il faudrait aussi vérifier l'efficacité sur des échantillons naturellement contaminés et non pas artificiellement inoculés.

## Efficacité du 2,6-di (t-butyl)-p-crésol (BHT) et du champignon entomopathogène\* Purpureocillium lilacinum pour contrôler Tribolium confusum et réduire le taux d'aflatoxine B1 dans le maïs lors du stockage

Barra P, Etcheverry M, Nesci A. Efficacy of 2,6-di (t-butyl)-p-cresol(BHT) and the entomopathogenic fungus Purpureocillium lilacinum, to control Tribolium confusum and to reduce aflatoxin B1 in stored maize. *Journal of stored Products research* 2015;64: 72-79.

### Résumé

Cette étude teste l'efficacité du 2,6-di(t-butyl)-p-crésol, appelé aussi hydroxytoluène butylé (BHT) qui est un antioxydant synthétique utilisé pour contrôler certains insectes susceptibles de disperser les spores d'Aspergillus flavus. L'effet insecticide de Purpureocillium lilacinum a aussi été évalué. Deux types d'expériences ont été menés. D'une part, l'effet insecticide et/ou fongicide vis-à-vis de *Tribolium* confusum, insecte vecteur du champignon, et d'A. flavus a été analysé dans une culture stérile de maïs à différentes Aw\*. D'autre part, l'effet combiné des deux agents sur du maïs stocké, contaminé en aflatoxine a été testé. La croissance d'A. flavus est réduite aussi bien par BHT que par P. lilacinum. L'effet insecticide est plus faible quand l'Aw diminue. Le meilleur effet insecticide est observé lors du traitement combiné par BHT et P. lilacinum (80%). Il y a une synergie lors du traitement combiné. L'effet diminue en présence d'A. flavus (60%). En absence ou en présence de BHT ou de P.lilacinum, plus de 90% des insectes sont porteurs d'A. flavus. La diminution la plus importante du taux d'aflatoxine B1(AFB1) (99,3%) est observée lorsque le maïs est traité par P. lilacinum et le BHT à une Aw de 0,97.

## Commentaire

Cet article met en évidence que le traitement du maïs simultanément par du BHT et *P. lilacinum* stimule l'activité insecticide contre *T. confusum*, diminue la dispersion d'*A. flavus* et réduit considérablement la contamination des grains en AFB1. Il est intéressant de noter la baisse de la production d'AFB1 même lorsque la croissance du champignon n'est pas diminuée. Il faut mentionner que l'effet est plus important lorsque l'Aw est élevé, ce qui est particulièrement intéressant puisque c'est en présence d'Aw élevé que les moisissures et les insectes prolifèrent. Le BHT étant un antioxydant synthétique (E-321) déjà utilisé en agroalimentaire à raison de 75 à 400mg/kg d'aliment, le fait

de stimuler l'activité par P. lilacinum constitue une stratégie prometteuse pour limiter la contamination et diminuer les quantités de BHT utilisées. En effet bien que reconnu comme sûre par la FDA (food and drug administration) le BHT peut être toxique (allergie, élévation du cholestérol, reprotoxique...)

## Utilisation de sous-produits agricoles pour inhiber la synthèse d'aflatoxines par Aspergillus parasiticus : un traitement biologique de trois céréales pour le stockage à long terme.

**Sultana B, Naseer R, Nigam P.** Utilization of agro-wastes to inhibit aflatoxins synthesis by *Aspergillus parasiticus*: A biotreatment of three cereals for safe long-term storage. *Bioressource Technology* 2015;**195**:443-450.

## Résumé

Des feuilles de margousier et d'acacia à trois concentrations différentes (20%, 10%, 5% du poids de céréales) ont été ajoutées à 200 g de trois types de céréales (blé, maïs, riz) afin d'évaluer l'effet sur la production d'aflatoxines (B1, B2, G1, G2) par A. parasiticus. Les deux plantes inhibent cette production et sont d'autant plus efficaces que la dose utilisée est élevée. Les feuilles de margousier à raison de 20% dans le blé inhibent totalement la production d'AFB1 pendant quatre mois, celle d'AFG1 pendant cinq mois et celle d'AFB2 et AFG2 jusqu'à sept mois. Les feuilles d'acacia à 20% inhibent l'AB2 et l'AFG1 pendant trois mois et l'AFG2 pendant sept mois, et diminue de moitié la production d'AFB1. L'efficacité des deux plantes est moindre sur le maïs et sur le riz même si l'inhibition est quasiment de 100% le premier mois de stockage. Les feuilles de margousier protègent mieux à long terme, quelle que soit la céréale.

## Commentaire

Cet article met en avant la possibilité de maîtriser de manière simple et écologique la production d'aflatoxines lors du stockage de céréales sur une longue période à 30°C. Il aurait été intéressant d'identifier les composés responsables de cet effet. Les composés à l'origine des propriétés antifongiques incluent des dérivés terpéniques, des alcaloïdes, des acides phénoliques, des tanins et des saponines. Il faudrait avant de pouvoir utiliser ce genre de produit mener une étude de toxicité potentielle de ce type d'additifs. D'autre, il n'est pas évident que les ressources en feuilles de margousier ou d'acacia soient suffisantes pour développer un moyen à grand échelle.

## **CONCLUSION GÉNÉRALE**

Les Aspergilli sont les moisissures prédominantes parmi la flore de détérioration des céréales. Ces moisissures produisent des mycotoxines pouvant être dangereuses pour la santé. Ces études ont permis de mettre en évidence la possibilité d'utiliser des substances naturelles comme les glucosinolates issus de plantes de la famille des choux, ou des huiles essentielles de l'acacia ou de margousier comme antifongiques. Un antioxydant, le BHT, utilisé en agro-alimentaire a aussi montré son intérêt pour inhiber la croissance des moisissures et la production d'aflatoxines et/ou de patuline. Le contrôle du développement des insectes vecteurs de moisissures améliore l'effet protecteur. En combinant plusieurs agents bioactifs, l'effet inhibiteur est amplifié. Ces agents bioactifs pourraient constituer des méthodes alternatives à l'utilisation de fongicides synthétiques non dépourvus d'effets toxiques et limiter l'emploi en grande quantité de BHT. La recherche d'antifongiques issus de plantes est une des nouvelles approches pour le remplacement de produits chimiques.

## **GENERAL CONCLUSION**

Aspergilli are the most dominant fungi among deteriorating moulds notably in starchy cereals. These fungi produce mycotoxins responsible of health problem. These studies show the possibility to use natural substances, such glucosinolate produced by brassicace, or essential oils from neems as antifungic compounds. An antioxidant, the BHT used in food industry is able to inhibit fungi growth, biosynthesis of aflatoxins/patuline. Inhibition of insect development helps the protection. Combinaison of several bioactive processes increases the inhibitory effect. Search of antifungal agents of plant origin is one of the novel approaches for the replacement of synthetic preservatives.

## Lexique

a<sub>w</sub> : biodisponibilité de l'eau= humidité du grain

**Entomopathogène**: champignon parasite d'insectes ou autres arthropodes, pouvant entraîner leur mort

Fongicide: substance empêchant le développement des moisissures

Glucosinolate : hétéroside soufré

Isothiocyanate d'allyle: provient de l'hydrolyse de la

sinigrine par action de la myrosinase

Moutarde : plante de la famille des brassicacées (crucifères)

Myrosinase: enzyme impliquée dans les mécanismes de défense de certaines plantes et dont l'action est l'hydrolyse du glucose du glucosinolate

**Sinalbine**: p-hydroxybenzylglucosinolate se convertissant en parahydroxy-isothiocyanate

Sinigrine: 2-propénylglucosinolate se convertissant en isothiocyanate d'allyle, molécule à l'origine du goût piquant de la moutarde et du wasibi

### Revues de la littérature

1 Bhatnagar-Mathur P, Sunkara S, Bhatnagar-Panwar M, et al. Biotechnological advances for combating Aspergillus flavus and aflatoxin contamination in crops. Plant Science 2015;234:119-132.

## Autres publications identifiées

1 Salem MZM, Zidan YE, Mansour MAM *et al.* Antifungal activities of two essential oils used in the treatment of three commercial woods deteriorated by five common mold fungi. *International Biodeterioration and Biodegradation* 2015; **106**:88-9.

Des huiles essentielles provenant de l'eucalyptus ont montré leur efficacité pour inhiber la croissance de champignons comme Alternaria alternata ou Aspergillus niger. La fumigation de bois par ces produits permet de préserver le bois contre l'envahissement par ces moisissures.

2 Al-Saad LAAl-Badran Al, Al-Jumayli SA, et al. Impact of bacterial biocontrol agents on aflatoxin biosynthetic genes, aflD and aflR expression, and phenotypic aflatoxin B1 production by Aspergillus flavus under different environmental and nutritional regimes. International Journal Food Microbiology 2015;217:123-129.

Des bactéries ont été sélectionnées pour leur capacité à inhiber l'expression de deux gènes (afID et afIR) responsables de la biosynthèse d'aflatoxine. L'inhibition des gènes n'est toutefois pas totalement corrélée à la diminution de la production d'aflatoxine

Abbaszadeh S, Tavakoli R, Sharifzadeh A, et al. Lactic acid bacteria as functional probiotic isolates for inhibiting the growth of Aspergillus flavus, A. parasiticus, A. niger and Penicillium chrysogenum. Journal de *Mycologie Médicale* 2015;**25(4)**:263-267.

De bactéries lactiques ont montré leur intérêt pour inhiber la croissance d'Aspergillus niger, A. flavus, A. parasiticus et Penicillium chrysogenum. Ces bactéries pourraient constituer de nouveaux antifongiques utilisables en milieu médical.

## Liens d'intérêts :

□ Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt



Connaître, évaluer, protéger

## ulletin -cientifique

Édition scientifique • Bulletin de veille n° 29 • Septembre 2016 Notes d'actualité scientifique

Agents biologiques

## Utilisation des bactériophages en élevage ou en industrie agroalimentaire pour lutter contre les bactéries pathogènes

Période : septembre 2015 à décembre 2015

Michel GAUTIER | michel.gautier@agrocampus-ouest.fr

Agrocampus Ouest/Inra - laboratoire de microbiologie/UMR STLO 1253 - Rennes - France

Mots clés : aliment, antibiotique, aquaculture, assainissement, bactérie pathogène, bactériophage, phagothérapie

Face à l'émergence de souches bactériennes résistantes à de nombreux antibiotiques (1), les approches basées sur des alternatives à l'utilisation de ces molécules prennent de plus en plus d'importance. Les bactériophages étant capables de lyser rapidement les cellules bactériennes font partie de ces alternatives. S'ils ont été découverts au début du siècle précédent, leur utilisation en tant qu'agent antibactérien a été considérablement entravée par l'avènement des antibiotiques. Leur principal inconvénient est de présenter un spectre d'action beaucoup moins étendu que ces derniers (2). En 2014, le parlement européen a proposé une motion demandant aux membres de la communauté européenne de prioriser le développement de la phagothérapie comme complément à l'antibiothérapie (3). Le premier exemple discuté ici traite de l'utilisation d'un phage en aquaculture, afin d'empêcher l'infection des poissons contre une bactérie pathogène très commune. Le second, vise à limiter la multiplication d'une bactérie pathogène dans un aliment. Ces deux études sont caractéristiques de la démarche scientifique mise en place pour l'utilisation des phages en tant qu'agent bactéricide. Elles permettent d'évaluer les potentialités et les faiblesses de cette approche.

## Utilisation du phage FCVL-2 comme solution alternative, en aquaculture, contre la columnariose

Elina Laanto, Jaana K.H. Bamford, Janne J. Ravantii and Lotta-Riina Sundberg. The use of phage FCVL-2 as an alternative against columnaris disease in aquaculture. Frontiers in microbiology 2015, volume 8 Article 829

## Résumé

Flavobacterium columnare est une bactérie responsable de la columnariose\*, maladie qui touche plusieurs espèces de poissons, notamment utilisées en aquaculture (4). Afin de diminuer le nombre et la gravité des infections, les auteurs ont utilisé un phage actif contre cette bactérie (5). Ce bactériophage fait partie des Myoviridae\*. La taille de son génome est de 47,1 kb\*. Parmi les 74 ORF\* actuellement prédits, il reste 67,6% d'entre eux de fonction inconnue. Aucun gène n'indique de potentiel de lysogénie\*. Par contre deux protéines pourraient être des facteurs de virulence\* impliqués dans les interactions hôte/pathogène chez E. coli (6). La truite arc-en-ciel et le poisson zèbre ont été utilisés pour réaliser des expérimentations. L'infection de 260 truites arc-en-ciel s'est faite en plongeant les poissons pendant 2h, dans un aquarium contaminé par Flavobacterium columnare, à raison de 3.10<sup>6</sup> CFU<sup>10</sup>/ml. Chaque poisson était ensuite élevé séparément dans un petit aquarium pendant sept jours. Deux concentrations de bactériophages ont été utilisées : un phage par bactérie ajoutée et 10 phages par bactérie ajoutée. Au bout de cette période, le taux de survie des truites témoins infectées était de 8,3%. L'addition de phage a entrainé une longévité et une survie semblables au contrôle témoin non infecté. Le ratio de un phage pour une bactérie était le plus efficace (50% de survie). Le mode d'infection du poisson zèbre a été différent, puisque celui-ci a été exposé en continu (5.10<sup>4</sup> CFU/ml) pendant tout le temps de l'expérimentation. L'addition de phage, à un ratio de 1 pour 1, a permis la survie de 60% des poissons zèbres (contre 100% de mortalité dans le lot témoin).

## Commentaire

Les résultats de ces travaux sont plutôt probants, puisque la longévité et la survie des poissons sont considérablement améliorées. Le système est particulièrement efficace car l'addition du phage se fait en milieu liquide, ce qui favorise la rencontre entre le phage et la bactérie cible. En effet, cette dernière est présente dans l'eau ou à la surface des poissons, où débute en général l'infection des tissus. Cependant, plusieurs difficultés techniques restent à résoudre. Notamment, un des problèmes importants que rencontre la phagothérapie est l'apparition rapide d'une population bactérienne résistante aux bactériophages. Dans ce travail, l'expérimentation n'a pas été menée assez longtemps pour évaluer la probabilité d'apparition de ces résistances. De plus, l'étude ne porte que sur un seul phage et une seule souche de Flavobacterium columnare. Or, l'infection phagique est souvent souche spécifique (2), il est donc fort probable que des souches environnementales de Flavobacterium columnare ne soient pas sensibles au phage utilisé. D'un point de vue sanitaire, des travaux sur les protéines concernées, c'est-à-dire celles impliquées dans la virulence des phages, devront être menés afin d'évaluer le risque de dissémination de ces gènes à d'autres bactéries. Enfin, la phagothérapie nécessite l'inoculation de très grandes quantités de phages dans les bassins d'élevage : la préparation de stocks de phages à l'échelle industrielle nécessite de pouvoir les propager en milieux liquides. Or, le phage utilisé ici ne peut se propager que sur un milieu gélosé sur lequel la bactérie a été inoculée ; un tel système n'est pas envisageable pour préparer des solutions concentrées en phages. Les auteurs devront trouver de nouveaux phages pouvant être propagés en milieu liquide.

## Un nouveau bactériophage ciblant Cronobacter sakazakii comme potentiel agent biologique dans les aliments

Ju-Hoon Lee, Jaewoo bai, Hakdong Shin, Yeran Kim, Bookyung Park, Sungii Heu, Sanggryeol Ryu. A novel bacteriophage targeting *Cronobacter sakazakii* is a potential biocontrol agent in food..Applied Environmental microbiology.

## Résumé

L'objectif de ce travail était d'isoler un phage infectant Cronobacter sakazakii, bactérie impliquée dans des toxiinfections alimentaires graves, liées à l'ingestion de 'préparations pour nourrisson' contaminées (7). Le phage isolé et étudié appartient à la famille des Myoviridae. Son génome comprend 231 ORF putatifs. Seuls 20% de ces ORF correspondent à des fonctions connues chez les bactériophages. Aucune homologie avec des gènes codant des toxines connues ou impliqués dans la virulence bactérienne ou dans la lysogénie n'a été trouvée. Sur 17 souches de l'espèce sakazakii testées, dix sont clairement infectées par le phage et sept montrent une sensibilité à celui-ci. De plus, les auteurs ont identifié par mutagénèse dirigée, un gène codant une protéine flagellaire qui sert de récepteur au phage. Les auteurs ont ajouté ce phage à une préparation pour nourrisson artificiellement contaminée par Cronobacter sakazakii à raison 10<sup>2</sup>CFU/ml et ont étudié la viabilité de cette bactérie. Le bactériophage a été ajouté de manière à obtenir 10<sup>4</sup> ou 10<sup>5</sup> phages pour une bactérie. Les bactéries ont été ensuite dénombrées pendant l'incubation du lait à 37°C, sous agitation pendant 10h. A la plus forte dose de phage, il n'y avait plus de croissance de la bactérie même après dix heures démontrant ainsi la lyse de toutes les bactéries.

## Commentaire

Le principe de ce travail est d'utiliser les bactériophages pour tuer les bactéries pathogènes ou, tout au moins, ralentir leur multiplication dans les aliments (8,9). précédemment, l'efficacité du procédé est facilitée puisque l'aliment choisi est utilisé à l'état liquide. De plus, le lait était agité durant les 10h de l'expérimentation, condition de laboratoire qui favorise la rencontre phage/bactérie, mais qu'on ne retrouvera pas lors de son utilisation par le consommateur, puisque le lait n'est reconstitué que juste avant d'être donné au nourrisson. Un résultat intéressant est l'identification du récepteur phagique de la souche utilisée. Ce récepteur est flagellaire, or il a été montré que les souches résistantes au phage, suite à une mutation du gène impliqué, devenaient avirulentes\*, la mobilité du flagelle étant impliquée dans la virulence. Les auteurs n'ont cependant pas recherché les capacités de virulence de leur mutant résistant. Pour que le phage soit réellement efficace

il doit être efficace contre toutes les souches de *Cronobacter sakazakii*. Or seulement 17 ont été testées et seulement dix sont visiblement infectées. Les sept autres présentent une inhibition par le phage qu'il conviendrait d'investiguer afin d'établir clairement le spectre d'hôte\* du phage. Enfin, même si aucun gène codant des toxines ou des facteurs de virulence n'a été identifié sur l'ADN phagique, il n'en demeure pas moins que plus de 80% des ORF sont de fonctions inconnues et qu'à ce titre, l'utilisation à grande échelle de ce phage dans les aliments pose question.

## **CONCLUSION GÉNÉRALE**

Le choix de ces deux publications permet d'illustrer les potentialités de l'utilisation des bactériophages, pour limiter le développement des bactéries pathogènes en élevage et en agroalimentaire. Les deux exemples discutés ici se placent dans les utilisations les plus favorables des bactériophages: en surface de l'organisme à décontaminer ou dans un liquide. En effet, pour qu'il soit efficace, le procédé doit permettre une rencontre aisée du phage et de sa bactérie cible. C'est pourquoi la littérature fait souvent état de ce procédé pour le traitement des surfaces, notamment pour éradiquer des biofilms\* colonisant une plaie, les cathéters en milieu hospitalier ou les surfaces en agroalimentaire (10). D'ailleurs l'US FDA reconnaît l'utilisation des phages dans les aliments comme un procédé de biocontrôle. En thérapie humaine, il est aussi possible d'administrer les phages par voie sanguine mais l'organisme ainsi soigné peut produire des anticorps contre les particules phagiques. La réussite du procédé dépend aussi du spectre d'hôte du phage : ce dernier doit être actif sur le plus grand nombre possible de souches de l'espèce ciblée. Certains procédés utilisent un phage ayant un spectre d'hôte très étendu, et donc actif sur toutes les souches de l'espèce ciblée. Il est aussi possible d'utiliser des cocktails de phages différents permettant d'infecter la majorité des souches de l'espèce. Comme de très grandes quantités de particules phagiques sont utilisées sur du long terme, il est indispensable que celles-ci interagissent le moins possible avec le génome de la bactérie cible. C'est pourquoi, beaucoup de travaux visent à n'utiliser que des phages virulents, écartant ainsi les phages tempérés . En effet, l'insertion du génome des phages tempérés dans celui des bactéries conduit à l'apparition de variants résistants au phage. Cette insertion peut également entrainer des remaniements génétiques de la bactérie et aussi conduire à l'apparition de nouveaux phages lors de leur excision du chromosome bactérien, lorsqu'il y a multilysogénie. Il est aussi essentiel de sélectionner des phages qui ne peuvent véhiculer que leur propre ADN. En effet certains phages sont capables de transporter à la place de leur génome, de l'ADN bactérien, puis d'infecter par la suite d'autres bactéries avec celui-ci. Ce mécanisme appelé transduction généralisée peut conduire à l'acquisition de nouveaux gènes, par la bactérie receveuse. De plus, une analyse fine du génome phagique est nécessaire: celui-ci ne doit pas porter de gènes codant des facteurs de virulence ou des toxines connus et répertoriés dans les bases de données. Enfin, il convient de s'assurer que l'utilisation à grande échelle d'un phage actif sur la majorité des souches d'une espèce donnée ne provoque pas, par l'émergence d'autres espèces, de bouleversements écologiques délétères au sein de l'écosystème microbien concerné.

## **GENERAL CONCLUSION**

The choice of these two publications was based on the need to illustrate the potential of the use of bacteriophages to limit the development of pathogenic bacteria in breeding and agribusiness sectors. Both examples discussed here consider the most favorable use of bacteriophages: surface or liquid decontamination. Indeed, to be effective, the process must promote contact between the phage and the target bacterium. That is why literature often describes methods for the treatment of surfaces, namely for eradicating biofilms colonizing wounds or catheters in the health sector and for decontaminating industrial surfaces in the food sector (10). Moreover US FDA recognizes the use of phages in food as a process of biocontrol. In human therapy, it is also possible to administer the phage through blood but the body may produce antibodies against the phage particles. The success of the process also depends on the host range of the phage. This later must be active on the largest number of strains belonging to the target species. Some methods utilize phage with a very wide host range and which are therefore active on all strains of the target species. It is also possible to use different phage cocktails to infect the majority of the strains of the same species. As large quantities of phage particles are used to the long term, it is essential that they minimally interact with the genome of the target bacteria. Therefore, a lot of works is designed to use only virulent phages, thus removing temperate phages. Indeed, the insertion of the genome of the phage inside the bacterial genome leads to the appearance of phage-resistant variants<sup>18</sup>. It can also lead to the appearance of genetic mutants of the target bacteria. Moreover, in case of multilysogeny, new phages may appear by recombination during their excision from the chromosome. It also seems essential to select phages which DNA would be specifically packaged in the head of the bacteriophage. Indeed, these phages cannot perform generalized transduction, mechanism which can lead to the acquisition of new genes by the recipient bacteria. Moreover, a detailed analysis of the phage genome is necessary: the genome must not carry genes encoding virulence factors or known toxins listed in the database. Finally, it should ensure that the large-scale use of an active phage on the majority of the strains of a given species does not cause, by the emergence of other species, deleterious changes in the microbiobial ecosystem concerned.

## Lexique

Avirulent: Qui a perdu sa virulence

Bactériophage ou phage : Virus infectant spécifiquement les

bactéries

**Biofilm:** Développement d'une communauté microbienne composée d'individus adhérents entre eux et sur les surfaces

**CFU = Colonie Formant Unité** : Unité de mesure traduisant le nombre de bactéries viables ; chacune forme une colonie en se multipliant.

**Columnariose :** Maladie entrainant la mort des poissons et due à une bactérie, *Flavobacterium columnare*, qui provoque des ulcérations très importantes notamment au niveau des nageoires et des branchies

**Excision :** Phénomène qui permet à un prophage de s'extraire du chromosome bactérien et commencer un cycle lytique

**Facteur de virulence :** Composant d'un microorganisme qui est nécessaire ou qui potentialise sa capacité à provoquer une maladie

**Flagellaire :** Relatif au flagelle, organite filamenteux permettant la motilité à certaines bactéries

Kb: Kilobase: 1Kb=1000 bases nucléotidiques

**Lysogénie :** Etat caractérisant une bactérie qui présente un ADN phagique incéré sur son génome (prophage)

**Multilysogénie:** Etat caractérisant une bactérie qui présente plusieurs ADN phagiques incérés sur son génome (prophages)

**Myoviridae:** Grande famille de bactériophages à ADN double brin, possédant une queue contractile, une tête allongée ou isométrique

**ORF:** Open reading frame ou cadre ouvert de lecture : séquence d'ADN susceptible de coder une protéine

**Phagothérapie:** Utilisation des bactériophages comme moyen de lutte contre les bactéries pathogènes

**Préparation pour nourrisson:** Aliment lacté diététiques (ALD) destiné aux nourrissons, et pour lequel le terme 'maternisé' est interdit depuis les années 1990 (art. 18 Arrêté du 11 janvier 1994)

**Souche :** Une espèce bactérienne est constituée de plusieurs souches qui regroupent les individus qui se ressemblent.

**Spectre d'hôte** (bactériophage) : Etendue des souches ou des espèces chez lesquelles un bactériophage peut se multiplier

**Tempéré:** Se dit d'un bactériophage dont le génome est capable de s'intégrer dans celui de la souche bactérienne qu'il infecte. Tant que son génome est intégré, ce phage ne provoque pas de lyse de la cellule

**Transduction généralisée:** Capacité de certains phages à empaqueter, à la place de leur ADN, des fragments d'ADN bactérien puis, d'infecter par la suite les bactéries avec ces fragments.

Variant: mutant

**Virulent :** Se dit d'un bactériophage strictement lytique : l'infection de la bactérie conduit à sa lyse, libérant de nouveaux phages

## Publications de référence

- 1 Hollis and Ahmed Z. Preserving antibiotics, rationally. New Engl.J. Med. 2013;(369) 2474-2476.
- 2 **Drulis-Kawa Z, et al.** Learning from bacteriophages-advantages and limitations of phage and phage-encoded proteins applications. Curr. Protein Peptide Sci. 2012;(13):699-722.
- 3 **Parlemantary Assembly.** Phage therapy, a public Health Issue-Motion for a resolution, pp. 1-2, Council of Europe2014.
- 4 Declercq A, Haesebrouck F, Van der Broeck W, Bossier P and Decostere A. Columnaris disease in fish: a review with emphasis on bacterium-host interactions. Vet. Res. 2013 44:27.
- 5 Laanto E, Sundberg LR, and Bamford JKH. Phage specificity of the freshwater fish pathogen Flavobacterium columnare; Appl. Environ. Microbio. 2011;(77):7868-7872.
- 6 **Sandt CH, and Hill CW**. Four different genes responsible in nonimmune immunoglobulin-binding activities within a single strain of *Escherichia coli*. Infect. Immun. 2000;(68):2205-2214.
- 7 Drudy D, Mullane NR, Quinn T, wall PG, and Fanning S. Enterobacter sakazakii: an emerging pathogen in powdered infant formula; Clin Infect Dis 2006; (42):996-1002.
- 8 **Guenther S, Huwyler D, Richard S, and Loessner MJ.** Virulent bacteriophage for efficient biocontrol of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. App Environ Microbial 2009;(75):93-100.
- 9 Zhang H, Wang R, ad Hongduo B. Phage inactivation of foodborne Shigella on ready-to-eat spiced chicken. Poult Sci 2013;(92):211-17.
- 10 **Chan BK** *and* **Abedon ST.** Bacteriophages and their enzyme in biofilm control. Curr Pharm Design 2015;(2): 85-99.

## Revues de la littérature

Oliveira H, Sillankorva S, Merabishvili M, Kluskens LD, and Joana Azeredo. Unexploited opportunities for phage therapy J. frontiers in pharmacology 2015;6:(180).

Nobrega FL, Costa AR, Kluskens LD, and Azeredo J. revisiting phage therapy: new applications for old resources *Trends in Microbiology* 2015;**23** (4):185-90.

**Wessam AS, and Azzazy HME**. Phage aproved in food, why not as a therapeutic *Expert Rev. Anti infect. Ther* 2015;**13** (1):91-10.

Hyman P, and Abedon ST. Bacteriophage host range and bacterial resistance. Adv. Appl. Microbiol. 2010;(8): 217-248.

Revue décrivant tous les mécanismes que développent les bactéries afin de surmonter les attaques phagiques. La connaissance de ces mécanismes est essentielle en phagothérapie afin de pouvoir sélectionner des cocktails phagiques efficaces.

## Autres publications identifiées

particulièrement détaillés.

**Abedon ST.** Ecology of anti-biofilm Agents I: antibiotics versus bacteriophages. *Pharmaceuticals* 2015;**8**:525-58. *Revue très complète mettant en exergue les avantages de l'utilisation des bactériophages par rapport à celle des antibiotiques pour lutter contre les biofilms. Les modes de destruction de biofilms par ces deux agents bactéricides sont* 

**Abedon ST.** Ecology of anti-biofilm Agents II: bacteriophage exploitation and biocontrol of biofilm bacteria. *Pharmaceuticals* 2015;**8**:559-89.

Revue très complète explorant les modalités d'utilisation des bactériophages dans la lutte contre les biofilms notamment ceux rencontrés en milieu hospitalier. L'écologie des bactériophages au sein des biofilms est particulièrement étudiée.

## Liens d'intérêts :

□ Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt

## Les amibes libres, un cheval de Troie pour les bactéries pathogènes

Période : septembre 2015 à novembre 2015

Jérôme GUERLOTTÉ | jerome.guerlotte@univ-ag.fr

Université des Antilles - ISYEB, UMR 7205 CNRS MNHN UPMC EPHE - Pointe à Pitre - France

Mots clés: acanthamoeba castellanii, amibes libres, Campylobacter jejuni, Helicobacter pylori, jus de fruits, lait frais, Vibrio cholerae

Les amibes se rencontrent dans tous les environnements naturels (sols, rivières...) et artificiels (habitations, élevages, réseaux d'eau, équipements industriels agro-alimentaires ou médicaux..). Ces eucaryotes unicellulaires sont en interaction constante avec les biofilms et possèdent la capacité d'héberger, de protéger et de disséminer des micro-organismes pathogènes avérés ou émergents. Par ailleurs, certaines de ces amibes, du genre *Acanthamoeba*, en particulier au stade de kyste, présentent une résistance très élevée aux traitements de désinfection ou de décontamination (1). Ainsi, de nombreuses espèces bactériennes pathogènes, telles que les légionelles ou les mycobactéries, dont l'importance en santé humaine et animale est en constante augmentation, utilisent ces amibes comme cheval de Troie pour survivre et proliférer dans les milieux hostiles. Les articles de cette note s'intéressent à cet aspect de la résistance des bactéries et illustrent l'importance de sa prise en compte dans l'évaluation du risque d'exposition aux microorganismes dans l'environnement hydrique et dans les produits de consommation. L'étude de Van der Henst *et al.*, (2015) décrit un mode de cohabitation original, entre le vibrion du choléra et l'amibe libre *A. castellanii*. L'article de Olofsson *et al.*, (2015) montre que le lait et les jus de fruits non pasteurisés peuvent être responsables d'infections à *Campylobacter jejuni*, quand le pathogène est en présence de l'amibe *A. polyphaga*, tandis que celui de Moreno-Mesonero *et al.*, (2015) montre comment *Helicobacter pylori* est capable de survivre à un traitement de chloration, si la bactérie est associée à l'amibe *A. castellanii*.

## Une niche de réplication intracellulaire pour Vibrio cholerae au sein de l'amibe Acanthamoeba castellanii

Van der Henst C, Scrignari T, Maclachlan C, Blokesch M. An intracellular replication niche for Vibrio cholerae in the amoeba Acanthamoeba castellanii. The ISME Journal 2015: 1–14

## Résumé

Le choléra est une maladie diarrhéique causée par la bactérie aquatique Vibrio cholerae qui reste une menace grave pour la santé des populations. Dans les eaux contaminées, le vibrion se trouve à l'état libre ou associé au plancton (2). Par ailleurs, l'amibe libre Acanthamoeba castellanii que l'on retrouve aussi dans les milieux aquatiques (3) et dans les mêmes habitats que le vibrion a été décrite comme un réservoir de bactéries pathogènes (4). Elle est caractérisée par une forme trophozoïte, active du point de vue métabolique dans les environnements favorables et un stade kystique, dans les environnements défavorables, muni d'une paroi rigide qui lui permet de résister aux traitements désinfectants et autres stress environnementaux (5). Différentes études, basées sur des comptages de colonies, ont montré que V. cholerae survit mieux en présence des amibes qu'en leur absence, mais sans en préciser les mécanismes intracellulaires (6). L'étude présentée ici, utilise une approche d'imagerie cellulaire qui révèle un mode de cohabitation original, entre V. cholerae et l'amibe libre A. castellanii.

Les auteurs montrent que la plupart des vibrions phagocytés par l'amibe se retrouvent dans de petites vésicules d'endocytose qui fusionnent avec les phagolysosomes dans lesquels ils sont digérés, tandis que certains d'entre eux, non digérés, sont relargués dans l'environnement par exocytose. De plus, les auteurs ont découvert qu'une fraction des vibrions résiste à la digestion en colonisant la vacuole contractile, un compartiment très dynamique de l'amibe, impliqué dans l'osmorégulation et qui leur offre un environnement protecteur. Les vibrions peuvent se multiplier dans la vacuole, la détruire pour proliférer dans le cytoplasme ou conserver cette niche intracellulaire jusqu'à l'enkystement, s'y multiplier et se disséminer dans l'environnement en lysant la paroi du kyste.

Par ailleurs, les auteurs ont montré que les polysaccharides du vibrion sont impliqués dans la lyse de la vacuole, et que le système moléculaire QS qui est un mécanisme de communication, serait impliqué dans la virulence. Vibrio cholerae est donc un pathogène intracellulaire facultatif et ce mode de cohabitation au sein des amibes augmente sa survie et sa prolifération dans l'environnement.

## Commentaire

Les travaux sur le vibrion cholérique concernent le plus souvent les aspects cliniques de la maladie. La première originalité de cette publication est de s'intéresser à la nature insidieuse et complexe de l'agent pathogène ainsi qu'à son mode de vie dans l'environnement. Par ailleurs, si des travaux antérieurs ont déjà montré la prédation de *V. cholerae* par des flagellés, on sait beaucoup moins de choses sur les interactions entre le vibrion cholérique et les amibes libres, ainsi que sur les mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents. L'étude de ses interactions avec *A. castellanii* confère à cet article un intérêt supplémentaire.

Par ailleurs, l'utilisation de la microscopie confocale à balayage laser, doublée de la microscopie électronique à transmission, représente une approche d'investigation nouvelle, car les résultats vont au delà du simple comptage des colonies de vibrions en présence ou en absence d'amibes. L'imagerie cellulaire et les enregistrements vidéo permettent aux auteurs d'analyser de façon dynamique le comportement des vibrions au sein des amibes et de décrire précisément leur localisation subcellulaire. Enfin, la découverte d'une niche intracellulaire protectrice du vibrion cholera, au sein de la vacuole contractile, constitue le point réellement novateur de cette étude. En revanche, il est difficile de savoir si l'enkystement, la destruction de la vacuole et la lyse amibienne sont activement induits par le vibrion ou si la colonisation de la vacuole contractile entrave ses fonctions osmorégulatrices et aboutit à sa destruction passive suivie de celle du kyste.

## L'amibe libre commune Acanthamoeba polyphaga, augmente la survie de Campylobacter jejuni dans le lait et dans le jus d'orange

Olofsson J, Berglund PG, Olsen B, Ellstrom P, Axelsson-Olsson D. The abundant free-living amoeba, *Acanthamoeba polyphaga*, increases the survival of *Campylobacter jejuni* in milk and orange juice. *Infection Ecology and Epidemiology* 2015; **5**: 28675

## Résumé

Campylobacter jejuni est une bactérie responsable de nombreuses diarrhées humaines dans la plupart des régions du monde et provoque 200.000 infections chaque année dans l'Union européenne (7). La majorité des cas sont sporadiques et acquis à partir de volailles contaminées, mais de nombreuses autres sources existent, telles que le lait non pasteurisé, l'eau et les jus de fruits (8). Pourtant, contrairement à de nombreux autres agents pathogènes d'origine alimentaire, C. jejuni est sensible aux conditions environnementales et en particulier à l'acidité des jus de fruits (9). Cependant, des études de co-cultures avec l'amibe libre Acanthamoeba polyphaga, ont montré qu'elle pouvait héberger C. jejuni et le protéger des pH faibles (10). Ces amibes très répandues ont été isolées à partir des systèmes de distribution d'eau à travers le monde. L'utilisation d'eau pour préparer les jus à partir de concentrés, à la fois dans l'industrie et dans les ménages, est la principale source de leur contamination par Acanthamoeba spp. Ces amibes présentent un stade trophozoïte actif du point de vue métabolique dans les environnements favorables qui est capable de se transformer dans les environnements défavorables, en une forme kystique à double paroi, résistante à la chloration, aux antimicrobiens et aux désinfectants, ainsi qu'aux changements de pH et d'osmolarité (11). La capacité des amibes à résister dans ces conditions explique qu'on les retrouve sur les surfaces des équipements utilisés pour la préparation des aliments.

Dans cette étude, les auteurs ont étudié l'effet protecteur de l'amibe libre *A. polyphaga* sur la survie de *C. jejuni* dans le lait et dans le jus d'orange, après co-culture pendant 18h, 24h et 48h à +4°C, à température ambiante et après

pasteurisation. Les bactéries et les amibes ont été mélangées, avant, ou après addition de lait ou de jus. La survie des bactéries a été évaluée par estimation du nombre de colonies se développant sur plaques de gélose au sang. Les résultats montrent que la survie des bactéries est similaire dans le lait et dans le jus d'orange mais significativement plus élevée en présence d'amibes qu'en leur absence. Cet effet protecteur de l'amibe pour la bactérie est d'ailleurs plus prononcé à température ambiante qu'au froid. En revanche, l'effet protecteur des amibes n'existe plus après pasteurisation, confirmant ainsi l'efficacité du traitement. Les auteurs concluent que le lait et les jus de fruits frais, non pasteurisés, peuvent être responsables d'infections à *C. jejuni*, si le pathogène est associé aux amibes.

### Commentaire

Les bactéries de l'espèce C. jejuni sont décrites comme pathogènes alimentaires depuis 1972 et font l'objet d'une surveillance par les services de santé publique depuis 1982. Il est donc bien connu que la consommation de volailles contaminées, de lait non pasteurisé ou d'eau de distribution non traitée présente un risque pour le consommateur. En revanche, la présence de C. jejuni dans les jus de fruits est bien moins documentée, compte tenu de sa faible résistance dans les milieux acides. L'originalité des travaux antérieurs de ces auteurs est d'avoir pris conscience dès 2005, que C. jejuni est capable d'infecter l'amibe libre A. polyphaga et de survivre dans des vacuoles, pour s'y multiplier et se disséminer en lysant son hôte (10). La publication, ici, va plus loin en précisant de façon quantitative que l'utilisation des amibes par C. jejuni pour survivre dans les milieux hostiles peut s'appliquer à des produits de consommation courante, comme le lait ou les jus de fruits dans lesquels le pathogène et l'amibe peuvent être présents simultanément. La principale limite de cette étude réside dans l'utilisation d'un ratio d'infection (MOI)\* un peu élevé, d'environ une bactérie par amibe dans les co-cultures, car dans la majorité des cas, la concentration des amibes dans du jus ou du lait est probablement beaucoup plus faible.

## Utilisation de la technique DVC-FISH et de la PMA-qPCR pour évaluer la survie d'Helicobacter pylori à l'intérieur de l'amibe libre Acanthamoeba castellanii

Moreno-Mesonero L, Moreno Y, Alonso, JL, Ferrus MA. DVC-FISH and PMA-qPCR techniques to assess the survival of Helicobacter pylori inside Acanthamoeba castellanii. Research in Microbiology 2015 (xx):1-6.

## Résumé

Helicobacter pylori est une bactérie pathogène, potentiellement cancérogène et sa transmission par l'eau pourrait passer par la voie fécale-orale (12). Par ailleurs, les amibes libres du genre Acanthamoeba sont des protozoaires ubiquistes que l'on retrouve également dans l'eau (13) sous deux formes, le trophozoïte métaboliquement actif qui se nourrit de bactéries, et le kyste qui permet de résister aux environnements défavorables.

Certaines bactéries résistant aux amibes (ARB)\* sont capables de survivre, mais également de se reproduire à l'intérieur de ces protozoaires pour se mettre à l'abri des environnements nocifs (14). Toutefois, peu d'études jusqu'à présent ont étudié l'interaction entre *H. pylori* et les amibes libres (15). De plus, les méthodes de détection moléculaires classiques, telles que l'hybridation in situ en fluorescence  ${\rm (FISH)}^*$  ou la PCR quantitative  ${\rm (q\text{-}PCR)}^*$  permettent de détecter la présence des bactéries à l'intérieur des amibes, mais ne sont pas capables de faire la distinction entre des bactéries vivantes et mortes. Dans la présente étude, à la suite de 24h de co-culture et d'un traitement de désinfection pour tuer les bactéries extra-amibiennes, les auteurs ont combiné le comptage direct des germes viables (DVC)\* pour ne compter que les bactéries vivantes et la technique FISH pour les localiser, ainsi que la PMA-qPCR pour n'amplifier que l'ADN des bactéries vivantes. Les résultats révèlent la présence de formes viables de la bactérie à l'intérieur des amibes et démontrent que H. pylori est capable de survivre à un traitement de chloration si elle est en présence de l'amibe A. castellanii.

## Commentaire

On sait maintenant qu'un certain nombre de pathogènes hydriques humains, tels que Campylobacter, Salmonella, Listeria ou Legionella appartiennent au groupe des bactéries ARB qui utilisent les amibes libres pour résister aux environnements désinfectants et se multiplier en augmentant ainsi leur potentiel d'infectivité (16). Cependant, peu de données existaient jusqu'à présent à ce sujet sur H. pylori, considéré pourtant comme l'agent infectieux le plus répandu au monde avec environ 50% de la population humaine infectée (17). Les études précédentes montraient seulement que la présence d'amibes augmente la survie du pathogène. Le point novateur de la présente publication est d'avoir utilisé des approches moléculaires combinées telles que la DVC-FISH et la PMA-gPCR pour révéler la présence d'H. pylori dans un état viable et potentiellement infectieux au sein de l'amibe A. castellanii. Toutefois, la microscopie photonique utilisée dans cette étude ne permet pas de préciser la localisation subcellulaire du pathogène, ni les mécanismes de colonisation mis en jeu. Pour démontrer qu'H. pylori appartient bien au groupe ARB, il reste aussi à montrer que la bactérie est capable de se répliquer à l'intérieur de l'amibe.

## **CONCLUSION GÉNÉRALE**

Les bactéries résistantes aux amibes peuvent être hébergées par ces protozoaïres très répandus dans l'environnement ce qui représente un mode de contamination qui doit être pris en compte dans la démarche d'évaluation des risques. Les publications sélectionnées décrivent ce phénomène pour trois espèces bactériennes de l'environnement hydrique, particulièrement pathogènes, Vibrio cholerae, Campylobacter jejuni et Helicobacter pylori. Les auteurs montrent que ces bactéries, comme cela a déjà été décrit pour Salmonella, Listeria, Legionella, Chlamydia ou pour les mycobactéries, sont également capables d'être phagocytées par des amibes libres du genre Acanthamoeba et de les utiliser comme cheval de Troie pour survivre dans des milieux hostiles. Les bactéries internalisées échappent à la digestion du protozoaire en s'abritant au sein de ses compartiments cellulaires, sont capables de s'y répliquer et profitent de la résistance à long terme de ces kystes amibiens pour attendre des conditions favorables à leur dissémination dans l'environnement. Il apparait ainsi, à la lecture de ces travaux, qu'il faut prendre garde aux amibes, car elles constituent un berceau évolutif pour les microbes internalisés qui développent sans cesse de nouvelles stratégies pour survivre et augmenter leur potentiel de transmission.

## GENERAL CONCLUSION

Amoeba-resistant bacteria can be hosted by these abundant protists in the environment, representing a new mode of contamination that must be considered in the risk assessment process. The publications presented here describe this phenomenon for three particularly pathogens bacterial species of the water environment, Vibrio cholerae, Campylobacter jejuni and Helicobacter pylori. The authors show that these bacteria, as described elsewhere for Salmonella, Listeria, Legionella, Chlamydia or Mycobacteria, are also phagocytosed by free-living amoebae of the genus Acanthamoeba and use them as a Trojan horse to survive in hostile environments. The internalized bacteria escape digestion in the protozoan, sheltering within its cell compartments, are able to replicate and enjoy the long-term resistance of amoebic cysts, waiting for more favorable conditions, to spread in the environment. It appears that free-living amoebae represent an evolutionary crib for internalized bacteria that develop new strategies to survive and increase their transmission potential.

## Lexique

ARB: Les bactéries résistantes aux amibes " amoebaresistant bacteria" (ARB) constituent un ensemble d'espèces bactériennes non digérées par les amibes qui peuvent être, soit lytiques pour leur hôte, soit ou au contraire capables de se répliquer à l'intérieur et en particulier dans les kystes, pour résister aux conditions défavorables de l'environnement telles que les traitements biocides.

**DVC**: Le comptage direct des germes viables "*Direct Viable Count*" (DVC) est réalisé après incubation des cellules avec un inhibiteur de synthèse d'ADN et un extrait de levures. Les bactéries viables, sensibles à l'antibiotique utilisent l'extrait de levures pour se diviser et prennent une forme allongée qui permet de les différencier et de les compter.

**FISH**: Le FISH " *fluorescence in situ hybridization* " ou hybridation *in situ* en fluorescence est une technique de biologie moléculaire et de cytogénétique utilisant des sondes nucléotidiques marquées à l'aide d'un fluorochrome pour révéler les gènes *in situ* sur des coupes observées en microscopie photonique et en imagerie moléculaire.

**MOI** : La multiplicité d'infection cellulaire " multiplicity of infection " (MOI) est définie par le rapport du nombre de microorganismes infectieux sur le nombre de cellules présentes

**PMA**: Le monoazide de propidium "propidium monoazide" (PMA) est un agent intercalant qui ne pénètre que dans les cellules dont la membrane est altérée et inhibe l'amplification de leur ADN par PCR, il est utilisé pour amplifier uniquement l'ADN des cellules vivantes.

**q-PCR**: La q-PCR "quantitative real-time polymerase chain reaction" ou PCR quantitative en temps réel est une méthode de polymérisation en chaîne qui permet de suivre la quantité d'ADN présente dans la réaction, au fur et à mesure de son amplification.

**QS**: Le système de détection du quorum "quorum sensing" (QS), correspond à un mécanisme moléculaire de régulation des gènes qui renseigne chaque bactérie sur la densité de la population de sa propre espèce ou des espèces environnantes, ce qui lui permet de mettre en place des comportements symbiotiques.

**Trophozoïte**: Le trophozoïte est la forme végétative d'un protozoaire, le corps cellulaire est déformable et dépourvu de flagelles, il se déplace par mouvements amiboïdes et se nourrit par phagocytose au moyen de pseudopodes.

## Publications de référence

- 2 Matz C, Kjelleberg S. Off the hook--how bacteria survive protozoan grazing. *Trends Microbiol* 2005;**13**:302-7.
- 3 Martinez AJ, Visvesvara GS. Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. *Brain Pathol* 1997;7:583-598.
- 4 Shanan S, Abd H, Hedenstrom I, Saeed A, Sandstrom G. Detection of Vibrio cholerae and Acanthamoeba species from same natural water samples collected from different cholera endemic areas in Sudan. *BMC Res Notes* 2011;4:109.

- 6 Abd H, Saeed A, Weintraub A, Nair GB, Sandstrom G. Vibrio cholerae O1 strains are facultative intracellular bacteria, able to survive and multiply symbiotically inside the aquatic free-living amoeba Acanthamoeba castellanii. *FEMS Microbiol Ecol* 2007;**60**:33-39.
- 7 **ECDC**. Annual epidemiological report 2014 -food- and waterborne diseases and zoonoses, Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control 2014;20-4.
- 8 **Domingues AR, Pires SM, Halasa T, Hald T.** Source attribution of human campylobacteriosis using a meta-analysis of case-control studies of sporadic infections. *Epidemiol. Infect.* 2012;**140**:970-81.
- 9 Park SF. The physiology of Campylobacter species and its relevance to their role as foodborne pathogens. *Int J Food Microbiol* 2002;**74**:177-88.
- 10 Axelsson-Olsson D, Waldenstrom J, Broman T, Olsen B, Holmberg M. Protozoan Acanthamoeba polyphaga as a potential reservoir for Campylobacter jejuni. *Appl Environ Microbiol* 2005;**71**:987-92.
- 11 **Thomas JM, Ashbolt NJ**. Do free-living amoebae in treated drinking water systems present an emerging health risk? . *Environ Sci Technol* 2011;**45**:860-9.
- 12 **Engstrand L.** Helicobacter in water and waterborne routes of transmission. *J Appl Microbiol* 2001;**90**:80-4.
- 14 **Barker J, Brown MR**. Trojan horses of the microbial world: protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment. *Microbiology* 1994;**140** ( Pt 6):1253-9.
- 15 Winiecka-Krusnell J, Wreiber K, von Euler A, Engstrand L, Linder E. Free-living amoebae promote growth and survival of Helicobacter pylori. *Scand J Infect Dis* 2002;**34**:253-6.

## Revues de la littérature

- 1 **Thomas V**. Amibes libres de l'environnement : écologie et interactions avec des micro- organismes pathogènes émergents *Faculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry*: Université Paris Sud-11 2012.
- 5 **Khan NA**. Acanthamoeba: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiol Rev* 2006;30:564-595.
- 13 **Rodriguez-Zaragoza S**. Ecology of free-living amoebae. *Crit Rev Microbiol* 1994;**20**:225-41.
- 16 **Greub G, Raoult D**. Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin Microbiol Rev* 2004;**17**:413-33.
- 17 Torres J, Pérez-Pérez G, Goodman KJ et al. A Comprehensive Review of the Natural History of Helicobacter pylori Infection in Children. Archives of Medical Research; 31:431-469.

## Autres publications identifiées

**Lu J, Struewing I, Vereen E, Moe C, Ashbolt N**. Molecular Detection of *Legionella* spp. and their associations with *Mycobacterium* spp., *Pseudomonas aeruginosa* and amoeba hosts in a drinking water distribution system. *J Appl Microbiol*. 2015 Nov 4.

Cette étude récente, conduite à grande échelle sur un réseau d'eau de distribution urbain aux USA, montre que les légionelles et les mycobactéries associées aux amibes libres sont les agents pathogènes opportunistes non fécaux les plus fréquemment rencontrés et pourraient servir d'indicateurs de la qualité microbiologique des eaux de distribution.

Lambrecht E, Bare J, Chavatte N, Bert W, Sabbe K, Houf K. Protozoan Cysts Act as a Survival Niche and Protective Shelter for Foodborne Pathogenic Bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 2015;**81**(16):5604-12

De nombreuses bactéries d'origine alimentaire (Salmonella enterica, Escherichia coli, Yersinia enterocolitica, and Listeria monocytogenes) associées à l'amibe libre Acanthamoeba castellanii, résistent aux traitements antibiotiques et aux pH acides et sont capables de se disséminer après sortie des kystes. Cette étude montre que le rôle des amibes libres dans la persistance et l'épidémiologie des agents pathogènes bactériens d'origine alimentaire est probablement sousestimé.

## Liens d'intérêts :

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt

# Métagénomique : quelles avancées pour l'évaluation de l'exposition microbiologique domestique ?

Période : septembre 2015 à novembre 2015

Steffi ROCCHI et Gabriel REBOUX | steffi.rocchi@univ-fcomte.fr

Université de Franche-Comté - UMR/CNRS 6249 Chrono-environnement, service de parasitologie-mycologie, CHU de Besançon – Besançon - France

Mots clés: métagénomique ciblée, micro-organismes, moisissures, bactéries, environnement intérieur, composts domestiques

La métagénomique ciblée (metabarcoding) permet d'établir un inventaire d'un type d'organisme donné dans un milieu complexe. Elle est basée sur l'analyse de l'ADN environnemental par séquençage haut débit (NGS\*) à partir de régions d'ADN ciblées, préalablement amplifiées par PCR\*. La métagénomique est de plus en plus utilisée pour caractériser la composition microbiologique de l'environnement intérieur (1-3). Les performances de cette méthode seraient supérieures à celles des méthodes d'analyses "classiques" disponibles (culture, qPCR pour les micro-organismes). En effet, c'est la première technique qui détecte les espèces non cultivables et/ou inconnues, avec des séquences non assignées\*. Les publications présentées réalisent une évaluation des communautés microbiennes par métagénomique au sein de logements et à l'extérieur proche. Le pyroséquençage\* a été utilisé dans la première publication pour évaluer les communautés fongiques de composteurs domestiques. Les auteurs de la deuxième publication ont eu recours à la technologie Illumina\* pour évaluer les communautés fongiques et bactériennes à l'intérieur et à l'extérieur de logements.

L'analyse métagénomique, avec code-barres moléculaires, de composts domestiques révèle des communautés fongiques distinctes avec un nombre important de séquences non assignées.

Langarica-Fuentes A, Fox G, Robson GD. Metabarcoding analysis of home composts reveals distinctive fungal communities with a high number of unassigned sequences. *Microbiology* 2015; (161):1921-32.

## Résumé

Le but de l'étude était d'évaluer la diversité des espèces fongiques de composteurs domestiques à Manchester par culture et pyroséquençage. Dix composteurs domestiques ont été analysés. L'analyse des 85 482 séquences obtenues par pyroséquençage a permis de déterminer la présence de 478 MOTUs fongiques réparties dans 3 phylums principaux, Ascomycètes, Mucoromycètes et Basidiomycètes. représentant respectivement 75,23%, 8,77% et 7,59% des séquences totales. Neuf ordres sont ressortis plus abondants et représentent 75% de la population fongique. Vingt principaux MOTUs ont été identifiés dans les composts domestiques et les plus abondants étaient Pseudallescheria fimeti, Thielavia sp., Trichocladium sp. et Penicillium commune. 2,46% des séquences ont été assignées à des moisissures non identifiées et 6,14% n'ont pas pu être assignées. Au total, 46,22% des séquences n'ont pas pu être assignées en dessous de la famille et sont, d'après les auteurs liées à la présence d'espèces non décrites. Les composts domestiques semblent présenter une diversité fongique plus importante que les composts industriels (par culture et par pyroséquençage) avec toutefois une plus faible abondance d'espèces thermophiles (résultats issus de la culture). L'analyse multivariée réalisée montre qu'une plus grande richesse en MOTUs est reliée à une faible teneur en eau et à un haut ratio carbone/azote.

## Commentaire

De nouvelles informations concernant la flore fongique qui peut être rencontrée dans les composts sont présentées ici. Ces nouvelles technologies, qui pallient les difficultés de culture et d'identification, permettent ainsi d'obtenir une nouvelle image des communautés présentes et amèneront surement un nouvel éclairage sur les espèces peu cultivables. Les conclusions concernant la relation avec les paramètres physico-chimiques seront à vérifier sur un plus grand nombre d'échantillons (seulement 10 ici). Une confrontation des résultats entre culture et pyroséquençage aurait pu être informative.

Concernant l'hypothèse de nouveaux genres et nouvelles espèces, les auteurs ont utilisé la seule base de données UNITE\* pour assigner leurs séquences. Or, certaines des séquences appartiennent peut être au règne végétal (séquence ITS\* commune) et ne peuvent ainsi pas être identifiées dans un référentiel uniquement fongique. La présence de nouveaux genres et espèces est donc probable mais il existe de fortes incertitudes liées à l'universalité des amorces et aux carences des bases de données. Enfin, la façon de traiter les données avant assignement est très importante. Avec le pyroséquençage, il est en effet

nécessaire de compenser les erreurs de séquençage (4) qui créent des MOTUs artéfactuels et qui privilégient les courtes séquences (biais aujourd'hui connu et qui mènera probablement d'ailleurs au déclin de cette technologie).

## L'écologie de la vie microscopique dans la poussière domestique

Barberan A, Dunn RR, Reich BJ, Pacifici K, Laber EB, Menninger HL, Morton JM, Henley JB, Leff JW, Miller SL, Fierer N. The ecology of microscopic life in household dust. Proc. R. Soc. B 282:20151139.http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2015.1139

## Résumé

Des échantillons de poussières sédimentées ont été prélevés sur des hauts de portes (intérieure et extérieure) d'environ 1200 logements de volontaires aux Etats-Unis répartis sous différents climats et les communautés fongiques et bactériennes ont été analysées par métagénomique (technologie Illumina).

65% des 125 066 phylotypes fongiques étaient communs entre l'intérieur et l'extérieur des logements, indiquant d'après l'analyse multivariée une origine extérieure probable des champignons retrouvés à l'intérieur. Les localisations géographiques des logements, avec des variables climatiques différentes, ont ainsi pour conséquence la présence de communautés fongiques différentes. Une analyse se focalisant exclusivement sur la part des séquences retrouvées de façon plus fréquente à l'intérieur (1,1% des phylotypes observés, dont Aspergillus, Penicillium, Alternaria) a montré que certaines caractéristiques du logement (présence d'un sous-sol, âge du bâtiment, présence de chien) avaient une influence significative, bien que faible.

Au contraire, pour la contamination bactérienne (72 284 phylotypes), la localisation géographique n'influence pas la communauté bactérienne à l'intérieur du logement. L'analyse réalisée sur les séquences retrouvées principalement à l'intérieur (1,6% des séquences) a montré que les occupants (nombre, ratio homme/femmes, animaux, insectes) influençaient la composition des communautés observées.

## Commentaire

L'analyse en détail par NGS\* des communautés intérieures et extérieures est novatrice. Elle apporte ainsi une comparaison exhaustive des communautés fongiques et bactériennes et montre des différences entre l'intérieur et l'extérieur. En revanche, l'échantillonnage pour mesurer les communautés par écouvillonnage des portes n'est pas standardisé : il peut être sujet à des variations en fonction des flux d'air ou même être dépendant des compétences du préleveur.

Les auteurs rapprochent la présence de *Lactobacillus* d'un rapport femmes/hommes > 0,5 alors que ceux-ci pourraient provenir d'autres facteurs confondants non étudiés, comme la consommation de yaourts ou de probiotiques. La répartition des moisissures semble être influencée par la localisation géographique, mais les 1100 logements (qui ont à la fois un prélèvement intérieur et extérieur) sont-ils assez

nombreux pour conclure à l'échelle des Etats-Unis et sont-ils aussi représentatifs en termes de climat ?

Ce travail montre que les principaux allergènes décrits dans la littérature sont présents à l'intérieur des logements. En revanche, il est regrettable que leur identification se soit arrêtée au genre.

Bien que l'utilisation des régions ITS1 ou ITS2 permette normalement une identification de résolution identique, il semblerait que la région ITS2 fournisse de meilleurs résultats. La région ITS2 est de longueur moins variable que la région ITS1. De plus, un intron 10 commun à de nombreux ascomycètes, présent sur la partie 18S peut entrainer des problèmes de co-amplification lorsque la région ITS1 est ciblée (5).

## **CONCLUSION GÉNÉRALE**

Les récentes techniques de métagénomique peuvent apporter des informations nouvelles dans l'inventaire exhaustif des micro-organismes présents dans divers environnements. Indéniablement elles permettront des avancées significatives dans la compréhension des interactions entre diverses communautés microbiennes. Cependant, la métagénomique ciblée montre pour le moment ses limites si elle devait être utilisée dans l'évaluation d'un risque pour la santé, où l'identification à l'espèce (pas toujours possible avec ces techniques) est indispensable. De plus, ces nouvelles technologies répondront de façon plus satisfaisante à la problématique des pathologies allergiques en prenant en compte les micro-organismes vivants et morts, comparativement aux pathologies infectieuses (organismes vivants thermotolérants). Enfin, la métagénomique ne permet pour l'instant qu'une approche semi-quantitative. Dans l'état actuel, ces technologies peuvent être utilisées pour lister des espèces d'intérêt ou de nouvelles familles/espèces qui devront être quantifiées plus spécifiquement par d'autres techniques quantitatives spécifiques comme la

## **GENERAL CONCLUSION**

Recent metagenomic techniques may provide new information concerning inventory of microorganisms in environments. They will allow significant advances in understanding the interactions between different microbial communities. However, metabarcoding analyses will be limited in the context of health risk evaluation where species level identification (not always possible with these techniques) is required. In addition, the metagenomic allows for now a semi-quantitative approach. In the current state, these technologies can be used to list species of interest or new families / species but which should be quantified specifically by other specific quantitative techniques as qPCR.

## Lexique

Intron: Fragment non codant d'une séquence d'ADN

**ITS**: « *Internal transcribed spacer* », région de l'ADN ribosomique, commune aux espèces fongiques champignons mais assez différente pour les différencier entre elles.

**MOTUs**: « *Molecular Operational Taxonomic Units* », une unité de séquences représentative d'une entité homogène qui peut correspondre à une espèce, un genre, une famille ou à une entité non décrite actuellement dans les banques de données (espèce non cultivable par exemple ou non décrite).

**NGS** : « *Next Generation Sequencing* » Séquenceurs de nouvelle génération qui ont permis de réduire les temps de séquençage de l'ADN

**PCR** : « *Polymerase Chain Reaction* », réaction de polymérisation en chaine qui duplique l'ADN à chaque cycle

**Pyroséquençage**: Technologie Roche (454). Séquençage qui se caractérise par l'incorporation de nucléotides les uns après les autres. L'incorporation de nucléotides se mesure par la détection de lumière produite (réaction avec luciférase).

**qPCR** : « *quantitative PCR* » Quantification spécifique de l'ADN d'organismes par réaction de polymérase en chaîne.

**Séquence non assignée** : Séquence d'ADN qui ne peut être associée à aucune séquence connue et disponible dans les différentes bases de données.

**Technologie Illumina**: Méthode de séquençage basée sur l'incorporation réversible de nucléotides fluorescents et sur la lecture optique de la fluorescence.

**UNITE**: Base de données du règne fongique disponibles pour l'assignement des séquences (https://unite.ut.ee/repository.php).

## Publications de référence

- 1 Adams RI, Miletto M, Lindow SE *et al.* Airborne bacterial communities in residences: similarities and differences with fungi. *PlosOne* 2014; **9**(3): e91283. doi:10.1371
- 2 **Kettleson EM, Adhikari A, Vesper S.** *et al.* Key determinants of the fungal and bacterial microbiomes in homes, *Environmental Research*, 2015; **138** : 130-5, doi:10.1016/j.envres.2015.02.003
- 3 Dannemiller KC, Mendell MJ, Macher JM, et al. Next-generation DNA sequencing reveals that low fungal diversity in house dust is associated with childhood asthma development, *Indoor Air*, 2014; **24**(3), 236-47.
- 4 Liu L, Li Y, Li S, et al. Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2012, 2012, Article ID 251364, 11 pages, doi:10.1155/2012/251364

5 **Lindahl BD, Nilsson RH, Tedersoo L** *et al.* Fungal community analysis by high-throughput sequencing of amplified markers-a user's guide. *New Phytol.* 2013; **199**(1):288-99.

## Revues de la littérature

**Kergourlay G, Taminiau B, Daube G** *et al.* Metagenomic insights into the dynamics of microbial communities in food, *International Journal of Food Microbiology*, 2015, 213 (2015) 31–39

## Autres publications identifiées

Shin SK, Kim J, Ha SM *et al.* Metagenomic Insights into the Bioaerosols in the Indoor and Outdoor Environments of Childcare Facilities, *PlosOne*, 2015, **10** (5)

Les auteurs ont analysés 50 échantillons d'air provenant de 5 centres de soins pour enfants et d'écoles à Séoul en Corée. La technologie utilisée ici est également le pyroséquençage. Les résultats montrent que les communautés fongiques seraient liées à l'extérieur alors que les communautés bactériennes sont influencées aussi par les activités humaines à l'intérieur.

Barberán A, Ladau J, Leff JW *et al.* Continental-scale distributions of dust-associated bacteria and fungi, PNAS, 2015 112 (18).

Cette publication a été écrite par les mêmes auteurs que la deuxième publication présentée dans cette note. Elle permet ainsi d'avoir les bases du travail réalisé dans la deuxième publication avec notamment les résultats obtenus concernant les prélèvements réalisés à l'extérieur des logements.

Madsen AM, Zervas A, Tendal K et al. Microbial diversity in bioaerosol samples causing ODTS compared to reference bioaerosol samples as measured using Illumina sequencing and MALDI-TOF, 2015.

Cette publication rapporte des résultats obtenus à partir de poussières récoltées près des travailleurs manipulant des graines (gazon). Le but de l'étude est d'évaluer les communautés en lien ou non avec le développement de syndrome toxique des poussières organiques chez les travailleurs.

## Liens d'intérêts :

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt

## La métabolomique et les biotoxines marines

Période: septembre 2015 à novembre 2015

Florence MONDEGUER | florence.mondeguer@ifremer.fr

Ifremer - Laboratoire phycotoxines - Nantes - France

Mots clés : biotoxines, biomarqueurs, métabolomique, microalgues, moules, spectrométrie de masse haute résolution (HRMS), workflow

La sécurité alimentaire est devenue un enjeu majeur mondial. De nombreuses contaminations alimentaires dues à des pathogènes ou à des toxines se produisent encore, à la fois dans des pays en développement ou industrialisés, sans que ces empoisonnements ne puissent toujours être reliés à un aliment en particulier. L'apparition de l'effet pouvant de fait, être progressif et ne pas avoir été détecté jusqu'à ce que des dommages chroniques ou permanents se soient produits(1).

C'est le cas des biotoxines marines qui sont produites par des microalgues, principalement des dinoflagellés, dont les populations peuvent proliférer, dans certaines conditions environnementales,

Au cours de ces efflorescences les biotoxines marines constituent un risque important de sécurité alimentaire lorsqu'elles s'accumulent dans des coquillages consommés par l'homme et qu'elles provoquent des syndromes divers (gastro-intestinaux, neurologiques etc...). On estime que les toxines des dinoflagellés provoquent de 50.000 à 500.000 cas d'intoxication par an, avec un taux global de mortalité de 1,5% (2)

En conséquence, il est nécessaire de disposer d'outils de surveillance sensibles et efficaces pour détecter les biotoxines marines (3-4-5) en particulier mais aussi leurs biomarqueurs(6), de manière à garantir à la fois la sécurité des consommateurs et protéger les industries aquacoles d'éventuels dommages financiers.

Les composés connus que sont les toxines, les résidus de substances chimiques et autres contaminants, sont efficacement analysés à l'aide de méthodes dites ciblées.

Cependant, ces approches classiques ne permettent pas de cartographier par exemple, la diversité chimique, ni la gamme étendue des métabolites secondaires bioactifs qui jouent un rôle important ou potentiel dans les interactions écologiques. Ainsi la mise en évidence de métabolites libérés par le phytoplancton, ou de biomarqueurs prédictifs et hiérarchisés liées à des perturbations toxiques, nécessitent de nouvelles stratégies sans à priori (7, 8).

Parmi ces nouvelles stratégies, qui compensent le manque d'exhaustivité des analyses conventionnelles, la métabolomique \* met en jeu l'analyse d'un grand nombre de molécules organiques de petites tailles et inférieures à 1500 Da (9-10-11), à partir d'empreintes chimiques globales et d'outils bioinformatiques de fouille de données. Si la grande diversité structurale et physicochimique des métabolites met en œuvre un grand nombre de techniques analytiques, l'identification et la caractérisation des molécules de l'empreinte chimique (12) font appel à essentiellement des techniques de haute résolution comme la RMN et la spectrométrie de masse.

Ce type d'approche globale, en fort développement (13) est pourtant un outil encore peu utilisé dans le domaine des biotoxines marines. Ainsi pour cette note il n'a pas été possible de regrouper sur 2015, trois articles ne ciblant spécifiquement que le champ de la métabolomique et des biotoxines marines.

De ce fait, cette note explore divers sujets tels que (i) l'intérêt de caractériser le métabolisme d'organismes, comme des moules, vivants dans un environnement naturel, perturbé ou pas par la présence de contaminants, (ii) l'avantage du criblage non ciblé comparé, de toxines marines, dans des extraits de moules ou sur des échantillonneurs passifs et (iii) la perspective élargie d'un workflow indépendant pour décrire le métabolome d'une cyanobactérie marine.

## Réponses métabolomique de palourdes en cage, Ruditapes decussatus, exposées aux intrants agricoles et urbaines d'une lagune côtière méditerranéenne (Mar Menor, SE Espagne)

Campillo, J.A., Sevilla, A., Albentosa, M., Bernal, C., Lozano, A.B., Canovas, M., Leon, V.M., 2015. Metabolomic responses in caged clams, Ruditapes decussatus, exposed to agricultural and urban inputs in a Mediterranean coastal lagoon (Mar Menor, SE Spain). Science of the Total Environment 524, 136-147.

## Résumé

Dans cette étude, par le biais d'un design expérimental soigneusement construit et d'une plate-forme métabolomique, des données ont été collectées puis acquises par LC-MS\*. Des analyses statistiques multivariées et des identifications discriminatives ont été menées, ainsi que la caractérisation de métabolites. Plus de 70 métabolites primaires connus ont été mesurés simultanément dans 200 palourdes réparties sur 3 sites, de manière à caractériser, les réponses métaboliques de ces organismes face à une pollution environnementale (agriculture intensive et forte concentration urbaine). A cela s'ajoute une comparaison à J7 et J22 des réponses métaboliques données par les glandes

digestives de palourdes soumises à différents niveaux d'exposition aux contaminants présents dans cette lagune (principalement des pesticides et produits pharmaceutiques).

### Commentaire

La contribution de cet article se fait à deux niveaux. Le premier, est de montrer qu'une diminution drastique de la concentration en taurine est un biomarqueur particulier des zones polluées, et le second est d'avoir réalisé l'étude en milieu naturel, alors que la majorité des études précédentes ont été réalisées dans des conditions contrôlées, en laboratoire.

Les seules limites de l'article proviennent de l'argumentaire final qui tendrait à faire croire que la détection SIM\* par LC-MS peut être considérée comme le moyen idéal pour valider les résultats obtenus et trouver de nouveaux biomarqueurs d'intérêt. Or, les profils métaboliques qui peuvent contenir de quelques centaines à des milliers de signaux (versus les 70 métabolites identifiés) sont impossibles à caractériser avec de tels systèmes analytiques dits de basse résolution\*.

En effet il faut avoir recours à une détection HRMS<sup>\*</sup> pour identifier et distinguer des métabolites discriminants (14) qui soient des biomarqueurs connus mais aussi non prévus, en rapport direct avec l'hypothèse de la contamination suspectée.

## Spectrométrie de masse haute résolution pour l'analyse quantitative et le dépistage non ciblé de toxines algales dans des moules et des échantillonneurs passifs

Zendong, Z., McCarron, P., Herrenknecht, C., Sibat, M., Amzil, Z., Cole, R.B., Hess, P., 2015. High resolution mass spectrometry for quantitative analysis and untargeted screening of algal toxins in mussels and passive samplers. Journal of Chromatography A 1416, 10-21.

## Résumé

Dans l'analyse des contaminants, l'échantillonnage passif a plutôt été présenté comme un outil lié à des études complémentaires d'investigation, tandis que dans cet article le couplage de l'analyse d'échantillonneurs passifs par l'analyse non-ciblée HRMS est utilisé comme une nouvelle approche, originale, pour la détection des toxines produites par les microalgues (phycotoxines). Les auteurs ont comparé les apports d'une résolution basse (triple quadripôle) ou haute (quadripôle à temps de vol et Orbitrap) dans la détection d'un large éventail de toxines extraites de moules ou d'échantillonneurs passifs. Dans cette étude c'est précisément l'effet de la matrice moules (Mytilus galloprovincialis) qui a été comparé à celui des échantillonneurs passifs. Pour réaliser ce travail, les 2 types de matrice ont été dopés à l'aide d'une large gamme d'étalonnage de standards des phycotoxines. A travers la conduite d'une approche non ciblée il est démontré que les effets matrice sont plus intenses dans les extraits de moules que dans les échantillonneurs passifs.

### Commentaire

De nombreux pays ont désormais fixé des directives réglementaires et établi les concentrations maximales admissibles pour les substances potentiellement dangereuses dans les fruits de mer.

Cependant, les toxines marines présentent une famille de molécules d'une grande variété aussi bien de par leurs structures chimiques, leurs masses moléculaires que leurs propriétés physico-chimiques et cette diversité rend non seulement difficile l'identification en routine des toxines connues, mais elle complique surtout la possibilité de déceler des indices de la présence d'autres toxines plus dangereuses mais inconnues, et/ou de leurs métabolites. Le développement de cette approche non-ciblée qui compare les profils d'organismes vivants métabolisant les toxines et de l'échantillonnage captant passivement les composés du milieu, ouvrent des perspectives multiples pour identifier ces composés rendus inaccessible par des matrices complexes et voir s'ils peuvent participer à établir une empreinte spatiale et temporelle d'un environnement donné.

## Extension du métabolome de la cyanobactérie marine Moorea producens JHB expliqué à travers des Workflows independants de produits naturels.

Boudreau, P.D., Monroe, E.A., Mehrotra, S., Desfor, S., Korobeynikov, A., Sherman, D.H., Murray, T.F., Gerwick, L., Dorrestein, P.C., Gerwick, W.H., 2015. Expanding the Described Metabolome of the Marine Cyanobacterium Moorea producens JHB through Orthogonal Natural Products Workflows. Plos One 10.

## Résumé

La cyanobactérie marine *Moorea-producens-JHB*, est une souche jamaïcaine qui a été très largement étudiée par le biais de toutes les techniques classiques appliquées aux produits naturels

Dans la présente étude, les auteurs ont utilisé une approche de «réseau moléculaire» par LC-MS/MS<sup>5</sup>, différente des étapes classiques d'isolement des ions pour l'élucidation structurale des molécules, pour représenter le métabolome de la cyanobactérie et découvrir de nouveaux dérivés halogénés de la famille des hectochlorines et des jamaicamides connus pour être les métabolites II principaux de cette souche. De plus, sachant que les autres métabolites Il de cette souche seraient des composés mineurs, les auteurs ont croisé et retraité toutes les données issues de techniques analytiques alternatives réalisées sur leurs extraits brutes ou purifiés, dont le séquençage du génome, toutes conduites indépendamment les unes des autres « orthogonal worflows<sup>7</sup> » pour ainsi montrer l'aptitude de cette souche à produire un autre composé isolé comme sans rapport avec les jamaicamides ou les hectochlorines.

## Commentaire

Pour pouvoir explorer pleinement le métabolome secondaire d'un organisme, il est nécessaire de disposer d'une forme de plateau technique intégrant des logiciels de bioinformatique permettant de visualiser les réseaux d'interactions moléculaires avec des profils d'expression des gènes et des données d'analyses de profilage métabolomique. L'ensemble des résultats obtenus dans la plateforme doit pouvoir également évoluer dans un environnement complété par des scripts et des connexions aux bases de données. Applicable à des échantillons complexes, récoltés directement sur le terrain, dans des environnements non axéniques, cette approche révèle des métabolites mineurs ou négligés mais pourtant impliqués de manière directe ou intermédiaire dans la biosynthèse du métabolome secondaire.

### **C**ONCLUSION GÉNÉRALE

La métabolomique représente une approche nouvelle d'évaluation de l'état de contamination des organismes, des compartiments environnementaux ou alimentaires, et de l'impact que la pollution marine, naturelle ou pas, peut avoir sur eux. A travers l'analyse de la variation des métabolites présents dans la cellule, les tissus, les organes ou même l'organisme entier il est possible de définir un état physiologie, un stade de développement ou encore un état de contamination.

D'une manière générale, l'analyse des métabolites corrélée à des plans d'expérience bâtis autour d'une question biologique ou environnementale claire, supportée par des outils sensibles et reproductibles, et donnant accès à des bibliothèques « maison » ou internationales, apporte autant de réponses que de questions posées. Il est ainsi possible d'expliquer par exemple comment l'exposition aux polluants chimiques tels que le plomb, peut provoquer une neurotoxicité, des perturbations dans le métabolisme de l'énergie, des perturbations osmotiques, une altération du métabolisme des lipides. Certaines études ont même prouvé que les perturbations métaboliques liées à l'effet conjugué des médicaments et des toxiques environnementaux apparaissaient souvent beaucoup plus tôt que les autres modifications induites par la pollution (15).

Néanmoins on le voit bien à la lecture des 3 articles, le potentiel de réponses apportées est bien fonction de la puissance des outils utilisés, plus la pluridisciplinarité des techniques est riche et plus les voies de biosynthèse sont compréhensibles. Seule l'approche de techniques complémentaires intégrées permet une détection holistique du métabolome, y compris ces composés produits en quantités infimes mais qui sont pourtant incontournables à la compréhension des mécanismes de biosynthèse. Il faut également souligner que la compréhension de l'état physiologique d'un organisme ou de sa perturbation suite à une contamination est une approche pluridisciplinaire nécessitant des échanges permanents entre le chimiste analyste, le statisticien / chimiométricien et le biologiste.

Un autre avantage non négligeable de l'analyse non ciblée HRMS et sans a priori, est qu'elle offre (sous couvert d'un archivage bien géré) des moyens significatifs pour des études rétrospectives. Ces études pourraient contribuer à définir par exemple l'émergence réelle de contaminant, ce qui est particulièrement pertinent dans l'étude de l'évolution de l'environnement.

## **G**ENERAL CONCLUSION

Metabolomics is a new approach to assess the contamination of organisms, environmental compartments or foodstuffs, and the impact marine pollution, (natural or anthropogenic), can have on them. Through the analysis of the variation of the metabolite profiles present in the cell, tissues, organs or even the whole organism it is possible to define a physiological state, a stage of development, or the level and nature of a contamination.

Generally, analysis of metabolites correlates to experimental design built around a clear biological or environmental question, needs to be supported by sensitive and reproducible tools, and requires access to libraries "house" or international. Often, the non-targeted approach allows for evaluation of many hypotheses.

Thus, it is possible to explain how exposure to chemical pollutants such as lead, may cause neurotoxicity, disruptions in the energy metabolism, osmotic changes or disturbance in lipid metabolism. Some studies have shown that the metabolic disturbances associated with the combination of drugs and environmental toxicants often appeared much earlier than other changes induced by pollution (15).

Nevertheless, as is clear from these three articles, the potential answer given is based on the power of the tools used, the more techniques are integrated into the approach, the more it is balanced and the easier biosynthetic pathways will be understood. Only orthogonal workflows allow for the holistic detection of the metabolome, including compounds produced in trace quantities which may nonetheless be essential to the understanding of biosynthetic mechanisms. Another important advantage of non-targeted HRMS analysis is that, if used in conjunction with a well-managed archive, it provides for retrospective studies that may help define the emergence of contaminants.

## Lexique

Analyse non ciblée: L'analyse de spectre total (ou « fullscan\* ») permet de détecter la présence de tous les composés ionisés, l'analyse est alors dite non ciblée. Dans ce cas le pouvoir résolutif de l'analyseur est primordial car c'est cette précision sur la mesure de la masse exacte qui permet de limiter le nombre de candidats putatifs répondant cette masse exacte

**Fullscan**: Balayage d'une gamme de masse dans laquelle on observe la totalité des ions formés dans cette gamme

HRMS: Spectrométrie de masse haute résolution, met en jeu des analyseurs haute résolution (TOF, secteur magnétique, FTICR, Orbitrap) qui permettent de discriminer les espèces isobares (nombreuses dans les fluides biologiques complexes) en donnant accès à la formule brute des ions détectés.

**LC-MS**: Chromatographie liquide couplée spectrométrie de masse

**LC-MS/MS**: Chromatographie liquide couplée spectrométrie de masse en tandem. Le 1<sup>er</sup> analyseur sélectionne l'ion «parent /précurseur», La cellule de collision fragmente (par collision induite) l'ion et le 2<sup>e</sup> analyseur analyse les ions « fils /fragments»

**Métabolome**: Ensemble de métabolites cellulaires. La métabolomique est l'analyse qui conduit à l'identification et la quantification de ces métabolites. http://www.metabohub.fr/index.php?lang=fr.

**SIM** ou (Single Ion Monitoring): L'analyseur est un simple quadripôle, c'est-à-dire: un analyseur de basse résolution (1000 maximum) avec une gamme de mase m/z: allant généralement de (0-4000 Da) et dans lequel le quadripôle fonctionne en filtre de masse réglé pour ne laisser passer que les ions d'un rapport m/z donné. La méthode est plus sélective et plus sensible que le fullscan. C'est un mode utilisé pour la quantification.

Workflow: C'est un anglicisme qui définit les étapes d'un processus d'analyse, sans les jeux de données proprement dits. Un workflow rassemble les analyses qui sont destinés à être exécutés (un ou plusieurs fois) avec différents ensembles de données d'entrée fournies par l'utilisateur. Ainsi à titre d'exemple, l'instance Galaxy propose une liste de worflows publiés à tester.

http://workflow4metabolomics.org/training/W4Mcourse2015.

## Publications de référence

- 1 **Giacometti J, Tomljanovic AB, Josic D.** Application of proteomics and metabolomics for investigation of food toxins. *Food Research International* 2013;**54**:1042-1051
- 2 Martinez I, James D, Loréal H. Application of modern analytical techniques to ensure seafood safety and authenticity: Food and Agriculture Organization of the United Nations 2005.
- 3 **Zhuo L, Yin Y, Fu W** *et al.* Determination of paralytic shellfish poisoning toxins by HILIC-MS/MS coupled with dispersive solid phase extraction. *Food Chem* 2013;**137**:115-21.
- 4 Rubies A, Munoz E, Gibert D *et al.* New method for the analysis of lipophilic marine biotoxins in fresh and canned bivalves by liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry: A quick, easy, cheap, efficient, rugged, safe approach. *Journal of Chromatography A* 2015;1386:62-73

- 5 **Senyuva HZ, Gokmen V, Sarikaya EA**. Future perspectives in Orbitrap (TM)-high-resolution mass spectrometry in food analysis: a review. *Food Additives and Contaminants Part a-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment* 2015;**32**:1568-1606.
- 6 **Plakas SM, Dickey RW**. Advances in monitoring and toxicity assessment of brevetoxins in molluscan shellfish. *Toxicon* 2010;**56**:137-149.
- 7 Ianora A, Bentley MG, Caldwell GS et al. The Relevance of Marine Chemical Ecology to Plankton and Ecosystem Function: An Emerging Field. *Marine Drugs* 2011;9:1625-1648.
- 8 Suarez-Ulloa V, Fernandez-Tajes J, Manfrin C, Gerdol M, Venier P, Eirin-Lopez JM. Bivalve Omics: State of the Art and Potential Applications for the Biomonitoring of Harmful Marine Compounds. *Marine Drugs* 2013;11:4370-4389.
- 9 **Combourieu B.** Du metabolisme au metabolome: complementarite des approches par RMN et spectrometrie de masse. *Spectra Analyse* 2007;36:20.
- 10 **Paris A**. Métabolomique et Sécurité Alimentaire. Copyright – Académie d'Agriculture de France 2008:Séance du 18 juin
- 11 **Junot C**. L'analyse métabolomique par spectrométrie de masse: un nouvel outil pour la biochimie clinique? *Bio tribune magazine* 2010;**34**:10-15.
- 12 Villas-Bôas SG, Mas S, Åkesson M, Smedsgaard J, Nielsen J. Mass spectrometry in metabolome analysis. *Mass spectrometry reviews* 2005;**24**:613-646.
- 13 **Fiehn O, Putri SP, Saito K, Salek RM, Creek DJ.** Metabolomics continues to expand: highlights from the 2015 metabolomics conference. Metabolomics 2015;**11**:1036-1040
- 14 Werner E, Heilier JF, Ducruix C, Ezan E, Junot C, Tabet JC. Mass spectrometry for the identification of the discriminating signals from metabolomics: current status and future trends. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2008;**871**:143-63.
- 15 Jones OAH, Dondero F, Viarengo A, Griffin JL. Metabolic profiling of Mytilus galloprovincialis and its potential applications for pollution assessment. Marine Ecology Progress Series 2008;369:169-179

## Revues de la littérature

**Beisken S, Eiden M, Salek RM**. Getting the right answers: understanding metabolomics challenges. *Expert review of molecular diagnostics* 2015;**15**:97-109.

**Gallart-Ayala H, Chéreau S, Dervilly-Pinel G, Bizec BL.** Potential of mass spectrometry metabolomics for chemical food safety. *Bioanalysis* 2015;**7**:133-146.

Martínez A, Garrido-Maestu A, Ben-Gigirey B *et al.* Marine Biotoxins *Hb25\_Springer Handbook of Marine Biotechnology*: Springer 2015;869-904.

**Angel Garcia-Sevillano M, Garcia-Barrera T**, Luis Gomez-Ariza J. Environmental metabolomics: Biological markers for metal toxicity. *Electrophoresis* 2015;**36**:2348-2365.

Suarez-Ulloa V, Fernandez-Tajes J, Manfrin C, Gerdol M, Venier P, Eirin-Lopez JM. Bivalve Omics: State of the Art and Potential Applications for the Biomonitoring of Harmful Marine Compounds. *Marine Drugs* 2013;11:4370-4389.

## Autres publications identifiées

**Mausz MA, Pohnert G**. Phenotypic diversity of diploid and haploid Emiliania huxleyi cells and of cells in different growth phases revealed by comparative metabolomics. *J Plant Physiol* 2015;**172**:137-48.

Dans cet article, l'approche métabolomique est réalisée à partir de l'extraction des métabolites intracellulaires et permet de différencier les phases haploïde et diploïde de la microalgue.

Kleigrewe K, Almaliti J, Tian IY et al. Combining Mass Spectrometric Metabolic Profiling with Genomic Analysis: A Powerful Approach for Discovering Natural Products from Cyanobacteria. Journal of Natural Products 2015;78:1671-1682

Les auteurs développent une nouvelle approche métabolomique combinant le profilage métabolique par spectrométrique de masse avec l'analyse génomique pour découvrir de nouveaux produits naturels issus de cyanobactéries

**Fiore CL, Longnecker K, Soule MCK, Kujawinski EB**. Release of ecologically relevant metabolites by the cyanobacterium Synechococcus elongatusCCMP 1631. *Environmental Microbiology* 2015; **17**:3949-3963.

Cette étude présente une caractérisation intéressante des métabolites intracellulaires et extracellulaires d'une culture de cyanobactéries à travers une triple combinaison de métabolomique ciblée, non ciblée (détection LC-MS positive et négative) et d'outils de génomiques

## Liens d'intérêts :

## Santé respiratoire des agriculteurs

Période: octobre 2105 à décembre 2015

Anne OPPLIGER | anne.oppliger@hospvd.ch

Institut universitaire romand de santé au travail, Université de Lausanne - Epalinges-Lausanne - Suisse

Mots clés : agriculteur, effet du travailleur sain, endotoxines, étude longitudinale, fonction pulmonaire, poussière organique

Dans la population agricole, les problèmes respiratoires aigus et chroniques sont très fréquents. Ces problèmes sont dus en partie à l'exposition à des poussières organiques présentes en grande quantité dans tous les secteurs agricoles. Ces poussières, composées entre autres de microorganismes, contiennent de fortes concentrations d'endotoxines issues de la paroi de certaines bactéries. Les effets sur la santé d'une exposition chronique aux endotoxines sont bien connus et concernent principalement des atteintes du système respiratoire (1). Cependant, paradoxalement, ce sont des substances qui ont un effet protecteur démontré vis-à-vis des problèmes allergiques. En effet, le fait d'avoir grandi dans une ferme avec des animaux diminue le risque de développer des allergies à l'âge adulte (2). Le mécanisme d'action de cet effet protecteur est du aux interactions entre les endotoxines et les cellules épithéliales pulmonaires (3).

Les études longitudinales sur la santé respiratoire des agriculteurs sont rares et sont confrontées à de nombreuses difficultés méthodologiques rendant l'interprétation des résultats difficile. Parmi ces difficultés, l'effet du travailleur sain a une place prépondérante. Néanmoins, la preuve d'une détérioration des paramètres respiratoires chez des agriculteurs a déjà été démontrée dans certains secteurs agricoles (4), mais les études incluant tous les secteurs agricoles sont inexistantes. Les deux articles analysés présentent les résultats d'études longitudinales menées sur des agriculteurs de plusieurs secteurs différents. Toutes deux ont suivi les paramètres fonctionnels respiratoires en mesurant en parallèle l'exposition des participants aux endotoxines. La première étude (Bolund *et al.*) se focalise sur les effets des poussières organiques sur des jeunes agriculteurs et la seconde étude (Spierenburg *et al.*) tente de mettre en évidence un effet du travailleur sain.

## L'évolution des fonctions pulmonaires chez les jeunes agriculteurs : suivi d'une cohorte sur 15 ans.

Bolund ACS, Miller MR, Basinas I, Elholm G, Omland O, Sigsgaard T, Schlünssen V. The effect of occupational farming on lung function development in young adults: a 15-year follow-up study. Occup Environ Med 2015;72:707-713.

## Résumé

L'objectif de cette étude réalisée au Danemark est d'évaluer l'effet du travail agricole, notamment l'exposition à la poussière organique, sur les fonctions pulmonaires de jeunes agriculteurs. La cohorte de base établie en 1992-1994 incluait 1 734 hommes et 230 femmes (âge moyen = 18,7 ans) fréquentant une école agricole ainsi que 407 témoins (jeunes militaires vivant en milieu rural, mais ne voulant pas devenir agriculteur). Le suivi fait en 2007-2008 incluait 866 agriculteurs, 96 agricultrices et 172 témoins. Les paramètres fonctionnels respiratoires ainsi que des mesures d'hyperréactivité bronchique et le statut d'atopie ont été mesurés au départ de l'étude et lors du suivi. La différence des paramètres respiratoires entre les deux mesures, exprimée en Δz-scores\*, a été calculée. De plus, l'exposition personnelle à la poussière et aux endotoxines durant la période du suivi a été estimée chez 327 agriculteurs. Les principaux résultats montrent que l'évolution des paramètres respiratoires des jeunes agriculteurs au cours des 15 ans de suivi ne diffère pas de celle des témoins. Cependant, quand on compare les personnes qui exercent toujours le métier d'agriculteur avec celles qui ont changé de

métier, un impact négatif est observé sur les paramètres mesurés chez les agriculteurs. Ceci étant certainement lié aux expositions chroniques à la poussière organiques et aux endotoxines pour les agriculteurs, il est aussi observé que cet effet est plus marqué chez les femmes certainement en raison d'une plus grande susceptibilité face à l'exposition professionnelle chronique. Il n'y a pas de différence entre les différents secteurs de travail de ces agriculteurs (élevage ou culture). Il est aussi montré que le tabagisme a un effet négatif uniquement chez les agriculteurs. De plus, le fait d'avoir grandi dans une ferme protège des atteintes respiratoires. En effet, les participants ayant grandi dans une ferme souffrent moins fréquemment d'asthme et ont de meilleurs paramètres respiratoires que ceux qui n'ont pas grandi dans une ferme alors que ceux qui n'ont pas grandi dans une ferme et qui avaient une hyperréactivité bronchique à 18 ans ont une moins bonne évolution de leurs paramètres respiratoires au cours du temps.

## Commentaire

Cette étude a le grand avantage d'offrir un suivi sur 15 ans d'une population importante de jeunes agriculteurs. Elle avait pour objectif de mettre en évidence les effets de la poussière organique sur la fonction pulmonaire de jeunes agriculteurs. Malheureusement, au final cet aspect n'a pas pu être renseigné, car il aurait fallu disposer de mesures répétées des paramètres respiratoires. De plus, l'effet du travailleur sain aurait pu être mesuré en comparant les fonctions respiratoires de base (au début de l'étude) des agriculteurs toujours en fonction avec ceux qui ont abandonné ce métier. Ceci aurait permis d'affiner les

résultats. Par ailleurs il pourrait être intéressant de compléter le dosage des endotoxines par la recherche d'autres contaminants biologiques.

## Analyse de l'effet du travailleur sain dans une cohorte d'agriculteurs hollandais

Spierenburg EAJ, Smit LAM, Heederik D, Robbe P, Hylkema MN, Wouters IM. Healthy worker survivor analysis in an occupational cohort study of Dutch agricultural workers. *Int Arch Occup Enviro Health* 2015;88:1165-1173.

## Résumé

Cette étude, menée en Hollande, a pour but d'analyser l'effet du travailleur sain<sup>3</sup> dans une cohorte de 901 travailleurs agricoles. Ces travailleurs sont soit des fermiers (bétail/porcs/céréales) (525 personnes), soit des employés de 23 firmes agro-alimentaires manipulant des bulbes de fleurs, des oignons, des graines et des aliments pour animaux (376 personnes). Un questionnaire incluant des questions sur des paramètres généraux, des symptômes respiratoires et des caractéristiques de leur travail avait été renseigné par tous ces travailleurs en 2005-2006. De plus, une souspopulation de 95 fermiers et 358 employés avait subi un examen médical incluant, entre autres, des mesures de fonctions pulmonaires. L'exposition personnelle aux endotoxines mesurée sur 82 fermiers et 116 employés agricoles avait permis de faire une matrice emploi-exposition pour les différentes tâches des travailleurs. Cinq ans plus tard, un nouvel examen médical a été proposé aux participants. En tout, 80 fermiers (taux de participation au suivi = 84 %) et 179 employés (taux de participation = 62 %) toujours en activité dans la même entreprise ont été inclus. Les autres (15 fermiers et 109 employés) ont donc été exclus du suivi.

Seulement 7,8 % des employés ayant quitté leur travail ont répondu au deuxième questionnaire en rapportant que ce changement de travail n'était pas lié à des problèmes de santé. L'effet du travailleur sain a été estimé en comparant les paramètres de base des participants inclus dans le suivi avec ceux exclus du suivi. Les résultats n'ont pas permis de mettre en évidence une sélection de travailleurs sains. C'està-dire qu'à la base, les paramètres de santé des participants ayant quitté/changé d'emploi ne sont pas différents des autres. Des petites différences entre les deux populations sont tout de même observées. Par exemple, les participants au suivi ont plus souvent grandi dans une ferme et ils ont un débit de pointe \* légèrement plus élevé et significatif que les autres. Parmi les participants ayant grandi dans une ferme, les employés exclus du suivi rapportent plus de symptômes d'allergie et de rhume des foins que ceux inclus dans le suivi.

## Commentaire

La limite de cette étude est le nombre restreint de participants qui ont pu être pris en compte pour l'estimation de l'effet du travailleur sain (259 et 124), ainsi que le déséquilibre entre la population d'agriculteurs et d'employés des différentes firmes ayant subi les tests médicaux au départ (95 vs 358), ce qui implique qu'au final, il n'y a que 15 agriculteurs dans le groupe des participants ayant quitté

l'étude contre 109 employés. De plus, très peu d'informations sur les raisons du changement professionnel (en lien avec la santé ou non) des personnes ayant abandonné le suivi sont disponibles. Dès lors, l'effet potentiel du travailleur sain a pu être dilué.

## **CONCLUSION GÉNÉRALE**

Ces études montrent qu'il est difficile d'analyser la santé respiratoire des agriculteurs. Des paramètres tels qu'un mode de vie « plus sain », un taux de tabagisme bas et les effets protecteurs des endotoxines contre les allergies sont étroitement intriqués avec les effets néfastes d'expositions chroniques à de multiples nuisances (chimiques, physiques et biologiques). Ainsi, un effet de travailleur sain n'a pas pu être mis en évidence et comme déjà démontré auparavant, il ressort l'existence d'un effet protecteur contre les allergies pour les personnes ayant grandi dans une ferme. En revanche, les paramètres pulmonaires sont davantage aggravés chez les agriculteurs que chez les ex-agriculteurs. Des mesures préventives pour diminuer l'exposition aux poussières organiques doivent être prises dans ce secteur.

## **GENERAL CONCLUSION**

These studies show that it is difficult to analyze the respiratory health of farmers. Parameters such a "healthy way of life", a low smoking rate and the protective effects of endotoxins against allergies are closely entangled with the adverse effects of chronic exposures to multiple nuisances (chemical, physical and biological). Thus, a healthy worker effect has not been demonstrated and, as already demonstrated previously, a protective effect against allergies for people being raised on a farm was shown. In contrast, a negative effect on lung functions is observed in current farmers compared to ex -farmers. Preventive measures to reduce exposure to organic dust need to be implemented in this work sector.

## Lexique

**Atopie**: prédisposition génétique à développer des allergies courantes, en rapport avec une hypersensibilité aux allergènes (pollen, allergènes alimentaires, acariens,..)

**Cellules épithéliales pulmonaires**: cellules qui tapissent l'intérieur des alvéoles pulmonaires, et font office de barrière physique contre les particules inhalées.

**Débit de pointe**: débit le plus élevé obtenu lors d'une expiration maximale la plus rapide possible, après une inspiration profonde.

Effet du travailleur sain (« healthy worker effect ») : effet de sélection selon lequel les travailleurs qui présentent un mauvais état de santé quittent le groupe ou choisissent un autre emploi. Cet effet peut conduire à une sousestimation de l'association entre exposition à une nuisance et maladie.

Endotoxines : éléments constitutifs de la paroi des bactéries à GRAM négatif. Les endotoxines possèdent comme parties biologiquement actives un fragment de paroi et du lipopolysaccharide (LPS). Les endotoxines sont essentiellement libérées lors de la lyse bactérienne et sont à l'origine d'actions sur le système immunitaire, la coagulation et l'inflammation. Leur inhalation peut être à l'origine de symptômes respiratoires.

**Z-score**: mesure standardisée de la position d'un paramètre respiratoire observé au sein de la distribution de ce paramètre dans la population de référence. Elle tient compte de la taille, de l'éthnie et de l'âge des personnes. Si les valeurs mesurées sont en accord parfait avec la population de référence, le z-score = 0.

## Publications de référence

- 1 Heederik D, Sigsgaard T, Thorne PS *et al.* Health effects of airborne exposures from concentrated animal feeding operations. *Environ Health Perspect* 2007; **115**:298-302.
- 2 Braun-Fahrländer C, Gassner M, Grize L, et al. Prevalence of hay fever and allergic sensitization in farmer's children and their peers living in the same rural community. Clin Exp Allergy 1999; 29:28-34.
- 3 **Schuijs MJ, Willart M, Vergote K,** *et al.* Farm dust and endotoxin protect against allergy through A20 induction in lung epithelial cells. *Sciences* 2015;**349**:1106-10.
- 4 Vogelzang PF, van der Gulden JW, Folgering H *et al.* Endotoxin exposure as a major determinant of lung function decline in pig farmers. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;**157**:15-8.

## Autres publications identifiées

1 Er M, Emri SA, Demir AU et al. Byssinosis and COPD rates among factory workers manufacturing hemp and jute. Int Occup Med Environ Health 2015;29:55-68.

Cette étude transversale turque montre des taux élevés de byssinose et de bronchite chronique parmi les travailleurs d'une usine de textiles manipulant du chanvre et du jute, et exposés à différentes concentrations d'endotoxines. Ces résultats sont intéressants car l'effet de la manipulation du chanvre et du jute sur la santé respiratoire ont peu été étudiés mais ces résultats ne concernent qu'une usine et ne peuvent être généralisés.

2 Wali Khan A, Kundi M, Moshammer H. Diminished pulmonary function in long-term workers exposed to cotton dust determined in a cross-sectional study Pakistani enterprises. *Occup Environ Med* 2015;**72**:722-27.

Cette étude transversale faite au Pakistan confirme que l'exposition aux poussières de coton a des effets négatifs sur la santé respiratoire des travailleurs.

3 Mackiewicz B, Skorsa C, Dutkiewicz J. Relationship between concentrations of microbial agents in the air of agricultural settings and occurrence of work-related symptoms in exposed persons. *Ann Agri Environ Med* 2015;22:473-77.

Cette méta-analyse, faite à partir de résultats obtenus durant 13 ans et provenant d'une région polonaise, a analysé les effets dose-réponse de différents microorganismes sur la santé, dans les milieux agricoles. Les résultats confirment les effets délétères des bioaérosols sur la santé respiratoire des agriculteurs.

## Liens d'intérêts :

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt



# de Jeille Connaître, évaluer, protéger de Jeille Cientifique

Édition scientifique • Bulletin de veille n° 29 • Septembre 2016 Notes d'actualité scientifique Qualité des milieux

## Réhabilitation d'anciens sites viticoles contaminés au cuivre

Période: septembre 2015 à novembre 2015

Thierry LEBEAU | Thierry.lebeau@univ-nantes.fr

Université de Nantes - LPG-Nantes UMR 6112 CNRS - Nantes - France

Mots clés : cuivre, phytoremédiation, phytotoxicité, sol, viticulture

En France, le vignoble représente 1,6 % de la surface agricole utile, et sa culture utilise 20 % des pesticides commercialisés (1), dont des fongicides à base de cuivre (Cu) employés pour lutter contre le mildiou. En raison d'applications répétées sur ces sols depuis plus d'un siècle, le cuivre s'est accumulé dans l'horizon de surface pour atteindre des teneurs qui varient entre 200 et 500 mg/kg de sol sec sur le pourtour méditerranéen (2), tandis que le fond géochimique\* ne dépasse pas 15 mg/kg (3). Le cuivre est un micronutriment essentiel à la vie à faible concentration, qui présente des activités antimicrobiennes à fortes concentrations bien que son impact sur la vie biologique des sols fasse l'objet de controverses (4).

Lorsque la vigne est définitivement arrachée, en raison de surproductions et/ou de la volonté d'améliorer la qualité des vins en n'exploitant que les meilleurs terroirs, le changement d'usage de ces sols, que l'on peut qualifier de pollués, se pose alors. Leur exploitation par des plantes tolérantes au Cu pourrait être une option intéressante, ces plantes assurant, dans le meilleur des cas, trois fonctions : couverture du sol afin d'éviter la dissémination du Cu dans l'environnement suite à des phénomènes d'érosion, dépollution et utilisation en alimentation humaine ou animale. On notera qu'autant la concentration en Cu dans les parties consommables est réglementée (5), autant il n'est pas interdit de cultiver sur des sols dont des teneurs en Cu dépassent largement celles du fond géochimique. Or il existe des plantes telles que la tomate et l'aubergine (6) qui accumulent très peu le Cu, et d'autres éléments traces tels que le cadmium, le chrome, le plomb, le zinc.

Cette note prend appui sur deux articles où sont testées des cultures de tomate et de tournesol sur des sols viticoles. La première étude vérifie que le fruit n'accumule pas de Cu contrairement aux parties aériennes de la plante (feuilles, tiges), la tomate pouvant ainsi potentiellement servir en phytoextraction\*. Dans le deuxième article, le tournesol est utilisé à la fois en phytoextraction et pour sa valorisation en bioénergie.

## Améliorer la connaissance sur la gestion des sols agricoles contaminés par du cuivre en cultivant de la tomate (Solanum Lycopersicum L.).

Sacristán D, Peñarroya B, Recatalá L. Increasing the knowledge on the management of Cu-contaminated agricultural soils by cropping tomato (*Solanum Lycopersicum* L.). *Land Degrad Develop* 2015;26:587-595.

## Résumé

Cet article porte sur un essai de réhabilitation de sols viticoles contaminés par du cuivre (Cu) grâce à des cultures de tomates, d'une part pour maintenir le potentiel productif de ces surfaces, d'autre part pour éviter la dégradation de ces terres par érosion. Quatre sols de caractéristiques différentes en région méditerranéenne espagnole ont été choisis, car représentatifs de sols agricoles méditerranéens d'Europe (7) : un fluvisol<sup>3</sup> salin (sol de Rojales), deux fluvisols calcaires (Sollana et Peníscola) et un fluvisol à gley (Nules). Les sols, conditionnés en pots de 4 kg, ont été artificiellement contaminés – de 1 à 100 fois la concentration mesurée dans les sols agricoles cultivés de la région de Valence – pour reproduire l'apport de Cu lors de l'application d'un pesticide ou d'un fongicide : 0,01 mg Cu/kg de sol sec (dose 1 servant de témoin), 65,9 mg/kg (dose 2), 659 mg/kg (dose 3), 1977 mg/kg (dose 4), 3295 mg/kg (dose 5) et 6590 mg/kg (dose 6). Le cuivre a été apporté sous forme de CuCl<sub>2</sub>, forme présente dans certains fongicides, puis le sol a été

équilibré pendant sept jours. Ces sols sont basiques (pH 7,5 à 7,7). Les taux de Cu extractible (à l'EDTA\*) des sols augmentent avec la teneur totale en Cu (valeurs extrêmes mesurées pour le sol de Rojales avec 12 % (dose 1) à 97 % (dose 6) de Cu extractible).

En général, la production de biomasse végétale diminue avec l'augmentation de la teneur en Cu (à partir de 659 mg Cu/kg de sol sec) mais dépend aussi du sol. Pour le sol de Nules, une augmentation de la biomasse entre les doses 1 et 2 (phénomène d'hormèse\*) est observée. Pour les sols de Sollana et Rojales, une décroissance graduelle de la biomasse avec l'augmentation de la concentration en Cu est mesurée. La toxicité du Cu sur la production de biomasse végétale a été évaluée de façon à établir les CE10 et CE50°. Selon le sol, la CE10 varie entre 32,9 et 491,4 mg Cu/kg sol sec et la CE50 entre 500,7 et 1 696,5 mg/kg, ce qui rend possible la culture de la tomate dans ces limites. Les concentrations tolérées sont inférieures pour les sols ayant les taux de matière organique et d'argile les plus faibles (respectivement 1,6 % et 33 % pour Rojales et 2,7 % et 25 % pour Peníscola) et lorsque les sols sont salins. La concentration en Cu des parties aériennes de la plante augmente avec celle du sol, mais les facteurs de bioconcentration (FBC\*) correspondants diminuent. Aucun signe de phytotoxicité n'est observé jusqu'à la 3<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> dose pour Peníscola et Rojales respectivement, et jusqu'à la 5<sup>e</sup> dose pour les deux autres sols. Les concentrations correspondantes en Cu de la biomasse aérienne (tiges et feuilles) sont légèrement supérieures à 20 mg/kg de biomasse sèche. Au-delà, des symptômes sont observés qui se répercutent sur la croissance; les plantes pouvant néanmoins accumuler jusqu'à 1 229 mg de Cu/kg de biomasse sèche pour une concentration en Cu du sol de 6 078 mg/kg (sol de Nules). La teneur en Cu des fruits était en revanche inférieure au seuil fixé par la commission de réglementation du Codex alimentarius\* (5), au moment de la parution de l'article, soit 10 mg Cu/kg de biomasse fraîche et ce, quelle que soit la teneur en Cu du sol. Cette expérimentation montre, qu'il était possible de produire à la fois de la tomate dont le fruit est consommable, quelle que soit la concentration en Cu du sol, tout en dépolluant le sol, puisque la biomasse aérienne accumule le Cu.

#### Commentaire

L'intérêt de cet article est de démontrer qu'il est possible de produire de la tomate sur d'anciens sols viticoles sans induire de risque pour le consommateur. Pour cela les auteurs se sont basés sur la teneur seuil pour le Cu, établie par le Codex alimentarius à 10 mg/kg de matière fraiche jusqu'en 2015. A partir de cette date, le cuivre n'est plus considéré comme un contaminant et les concentrations de cuivre dans les végétaux sont réglementées en Europe. La limite maximale de résidus (LMR) est de 5 mg/kg pour la tomate (règlementations (CE) No 149/2008 de la Commission du 29 janvier 2008 et (CE) 396/2005 concernant les limites maximales applicables aux résidus de pesticides présents dans ou sur les denrées alimentaires et les aliments pour animaux d'origine végétale et animale; également EU pesticide database:

http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=pesticide.residue.displayMRL&lang uage=FR. Or cette LMR est dépassée dans les conditions expérimentales utilisées dans la publication. Cette culture n'en reste pas moins potentiellement intéressante en raison de son faible potentiel d'accumulation du Cu même si les teneurs retrouvées dépassent légèrement la valeur maximale autorisée (7,4 à 9,9 mg/kg dans cette expérimentation).

Les pourcentages de Cu extractibles sont très élevés en raison de la contamination artificielle et d'un vieillissement du sol de seulement sept jours avant le début de l'expérimentation. Ces valeurs ne seraient pas réalistes pour des sols contaminés au Cu depuis longtemps. En revanche, elles traduisent bien l'apport d'un excès de Cu lors de l'application d'un fongicide.

20 mg de Cu/kg de biomasse aérienne est considéré comme étant la limite au-dessus de la laquelle des symptômes de toxicité sont observés, ce qui est trop peu pour envisager de dépolluer un sol par phytoextraction dans un temps raisonnable. La plante peut néanmoins accumuler beaucoup plus de Cu (malgré les symtômes de phytotoxicité) si la teneur en Cu extractible est élevée (dans cette étude jusqu'à 1 229 mg/kg de biomasse aérienne pour 4 979 mg Cu extractible/kg de sol). Mais l'étude ne précise pas le taux de réduction de la biomasse végétale correspondant à une telle concentration en Cu du sol.

En l'absence de méthode standard pour évaluer l'effet du Cu sur la croissance des plantes, les auteurs se sont basés sur les critères de l'USEPA (United States Environmental Protection Agency) qui considère qu'un sol est de qualité adéquate lorsque la concentration en Cu réduit la production de biomasse de 10 % (CE 10) à 50 % (CE 50) (8). Cette approche parait en effet pertinente même si on peut discuter du pourcentage maximum. Le FBC diminue avec la dose jusqu'à la dose 5 au-delà de laquelle il augmente probablement parce que la plante ne régule plus l'entrée de Cu.

## Phytoremédiation de sols viticoles et de déchets miniers contaminés par du cuivre par une culture à haut potentiel énergétique (Helianthus annus L.).

Andreazza R, Bortolon L, Pieniz S, Barcelos A A, Quadro M S, Camargo F A O. Phytoremediation of vineyard copper-contaminated soil and copper minig waste by a high potential bioenergy crop (*Helianthus annus* L.). *Chemosphere* 2015; **135**:312-318.

#### Résumé

Avec l'objectif de dépolluer des sols contaminés au cuivre (Cu) par phytoextraction tout en valorisant la biomasse (énergie), du tournesol a été cultivé sur deux sites viticoles brésiliens contaminés de longue date au Cu et sur des déchets miniers également riches en Cu. L'expérience a été réalisée en serre dans des pots de 2,5 kg de sol provenant de l'horizon superficiel (0-20 cm) d'un Mollisol et d'un Inceptisol\*, sols les plus représentatifs des vignobles brésiliens. Un Mollisol sans historique de Cu sert de sol témoin. Par ailleurs, un déchet minier riche en cuivre a été testé en le mélangeant au Mollisol témoin, à raison de 40 % et 60 % respectivement. Le fond géochimique est de 35 mg Cu/kg de sol sec. Les teneurs totales en Cu (et celles extraites) de l'Inceptisol, du Mollisol et du déchet minier sont respectivement de 507 (207), 281 (142) et 852 (576) mg/kg de sol. La culture dure 57 jours. À 15 et 30 jours, de l'azote est apporté (30mg/Kg de sol). Par rapport au sol témoin (sans historique de Cu), la taille des plantes est significativement plus importante lorsque le tournesol est cultivé sur un Mollisol et plus faible avec le déchet minier. Le Mollisol présente également les valeurs les plus élevées de biomasse aérienne et racinaire. Par contre, bien que les valeurs de biomasse des cultures sur déchets miniers soient en moyenne plus faibles, il n'y a statistiquement aucune différence. Le Cu engendre des symptômes de toxicité (chlorose\*) avec l'Inceptisol et les déchets miniers. Le contenu en différents micronutriments dans le tournesol diffère selon le support de culture employé. L'accumulation du Cu varie également selon le support de culture. Dans les parties aériennes, les racines, et la plante entière, l'Inceptisol accumule 41, 38 et 79 mg Cu/kg contre 17,5, 34,5 et 53 mg/kg pour le Mollisol, 15, 15 et 29 mg/kg pour la culture sur déchet minier et 21, 18 et 39 mg/kg pour le sol témoin.

Le FBC diminue fortement lorsque le sol est contaminé en Cu (4,71 pour le sol témoin, 0,19 et 0,24 pour l'Inceptisol et le Mollisol et 0,03 pour le déchet minier). Comparé au sol témoin, le FT<sup>\*</sup> du Mollisol diminue fortement (1,17 et 0,51 respectivement) et dans une moindre mesure pour l'Inceptisol (1,06) et le déchet (0,98). La quantité de Cu

exportée à l'hectare est minimum pour le déchet (171 g) et maximum pour l'Inceptisol (466 g). Le pourcentage d'extraction du Cu du sol est de 0,02% pour le déchet et 0,3% pour l'Inceptisol (0,94% pour le témoin).

#### Commentaire

Le sol témoin (Mollisol sans historique de Cu) prête à discussion, car il ne peut être comparé ni à l'Inceptisol ni au sol de déchet (mélange de Mollisol et de déchet). De même, bien qu'étant du même type que le Mollisol du sol de vignoble, la composition du sol témoin en Zn et N est très différente de même que (dans une moindre mesure) celle en C, Mg, Mn, P. Il s'agit donc plutôt d'un pseudo témoin. En effet, les différences de teneurs en Cu du sol n'expliquent probablement pas à elles seules les différences de croissance et d'accumulation du Cu, ni les différences de teneurs des autres micronutriments.

Le plus souvent les auteurs ne discutent pas les résultats sur la base des analyses statistiques mais des moyennes, ce qui fausse en partie les conclusions. Les FT sont calculés pour certains micronutriments (zinc, fer, manganèse, sodium); pas pour les autres sans que cela ne soit explicité.

Pour comparer les sols, un paramètre important aurait dû être considéré : la CEC<sup>14</sup>. En effet les différences de teneurs en argile et en carbone organique ne suffisent pas à expliquer les pourcentages de Cu extractible. Par exemple, les pourcentages de Cu extractible sont proches pour le Mollisol (50%) et pour l'Inceptisol (41%) alors que les pourcentages d'argile sont respectivement de 29 % et 19 %. Par ailleurs, des différences de structure du sol ont pu agir sur la croissance du tournesol et sur l'accumulation du Cu. Les différences d'accumulation du Cu selon le sol (ou mélange sol/déchet) utilisé ne s'expliquent pas uniquement par la fraction extractible: les pourcentages de Cu extractible les plus différents sont ceux du sol témoin (11%) et le déchet (68%) alors que les teneurs en Cu des parties aériennes (et racinaires) sont peu différentes. Le contraire s'observe quand on compare l'Inceptisol et le Mollisol. Une analyse multivariée auraient ainsi permis de mettre plus facilement en évidence les relations existantes entre les variables explicatives et expliquées.

Les auteurs justifient les phénomènes de chlorose par une modification de la mobilité du fer dans la plante. Pourtant le FT du fer ne change pas selon le support de culture employé, ni les teneurs en Fe dans les parties aériennes.

#### **CONCLUSION GÉNÉRALE**

Le pourcentage de phytoextraction du Cu a été calculé sur la base du Cu total. Il aurait été également intéressant de le déterminer sur la base du Cu extractible. D'un point de vue opérationnel, le stade de croissance où l'accumulation du Cu est maximale aurait pu être précisé et la teneur en Cu dans les graines mesurée afin de savoir si le tournesol peut être utilisé comme plante alimentaire, même cultivé sur sol pollué au Cu.

Les deux publications analysées dans cette note démontrent qu'il est d'une part potentiellement possible de réexploiter des sols viticoles abandonnés en région méditerranéenne avec la culture de la tomate (usage alimentaire) ou du tournesol (bioénergie), sans que ces plantes souffrent de la toxicité du cuivre, accumulé dans les sols depuis plusieurs décennies du fait de traitements fongicides. D'autre part, au-delà de l'intérêt de végétaliser des sols pour éviter (limiter) leur dégradation par érosion, la tomate pourrait être consommée, si les teneurs en cuivre ne dépassent pas la limite maximale de résidu (LMR) fixée à 5 mg/kg de matière fraiche, valeurs légèrement dépassées dans l'article mais pour des teneurs en Cu du sol qui peuvent atteindre 6 405 mg/kg de sol sec dont 6 224 mg/kg sont extractibles à l'EDTA – alors que la teneur en Cu des sols viticoles méditerranéens dépasse rarement 500 mg/kg de sol sec. Avec une demande de sols à l'échelle mondiale qui ne cesse de croître avec l'augmentation de la population, se pose la question de l'exploitation à des fins alimentaires des sols très enrichis en éléments traces tels que les sols viticoles pour le cuivre. Puisque certaines plantes (notamment les Solanacées) n'accumulent pas le Cu, elles pourraient être cultivées sur ces sols sans risque pour le consommateur. Le tournesol accumule au maximum 41 mg Cu/kg de biomasse sèche pour 507 mg Cu/kg de sol sec. Son utilisation en phytoextraction pourrait être envisagée.

#### **GENERAL CONCLUSION**

The two articles analysed in this note show on the one hand that it is possible to exploit again vineyard soils in the Mediterranean area with tomato (food product) or sunflower (bioenergy), without any phytotoxicity of copper used as a fungicide and accumulated in soils for decades. On the other hand, beyond the relevancy in revegetating soils to avoid (reduce) their degradation by erosion, tomato could be consumed if copper concentrations do not exceed the threshold (LMR) set at 5 mg/kg of fresh matter, the values from the article being slightly higher than the threshold but for concentrations of copper in soils that may reach 6.405 mg/kg of dry matter - 6.224 mg/kg being extractible by EDTA - while the concentration of copper in Mediterranean soils rarely exceed 500 mg/kg. With the increasing demand of soil at the world scale related to the increase of the population, the question arises of the use of soils enriched in trace elements such as vineyard soils for copper. Since some plants (notably Solanaceae), do not accumulate Cu, they could be cultivated without any risk for the consumer. Sunflower accumulate 41 mg/kg of dry matter at the maximum for 507 mg Cu/kg of dry weight soil. Its use for phytoextraction could be considered.

#### Lexique

**CE10 et CE50**: Dans le cas de la présente note, concentration de cuivre ajoutée au sol qui réduit de 10 % (CE10) ou de 50% (CE50) la production de biomasse végétale.

**CEC**: Capacité d'échange cationique. Quantité de cations que le sol peut retenir sur son complexe adsorbant à un pH donné

**Chlorose**: Décoloration plus ou moins prononcée des feuilles, due à un manque de chlorophylle dont la cause est une carence en fer.

Codex alimentarius: Le "codex general standard for contaminants and toxins in food and feed" a été mis à jour en 2015. Le cuivre n'est plus considéré par le Codex Alimentarius comme un contaminant. Voici l'extrait du rapport CODEX STAN 193/1995:

« Codex Alimentarius defines a contaminant as follows:

"Any substance not intentionally added to food or feed for food producing animals, which is present in such food or feed as a result of the production (including operations carried out in crop husbandry, animal husbandry and veterinary medicine), manufacture, processing, preparation, treatment, packing, packaging, transport or holding of such food or feed, or as a result of environmental contamination. The term does not include insect fragments, rodent hairs and other extraneous matter".

This Standard applies to any substance that meets the terms of the Codex definition for a contaminant, including contaminants in feed for food-producing animals, except:

Contaminants having only food and feed quality significance (e.g. copper), but no public health significance, in the food(s) given that the standards elaborated within the Committee on Contaminants in Foods (CCCF) has the objective to protect public health. "

http://www.codexalimentarius.org/normes-officielles/listedesnormes/fr/?provide=standards&orderField=fullReference&sort=asc&num1=CODEX

**EDTA**: Acide Éthylène Diamine Tétra-Acétique utilisé comme chélatant (ou complexant) en raison des complexes métalliques très stables qu'il forme.

**FBC** : Facteur de bioconcentration : concentration en Cu dans les parties aériennes de la plante rapportées à celle du sol

**Fluvisol**: Il s'agit d'un groupe de sols jeunes issus de dépôts alluviaux. Ce sont des sols couramment inondés que l'on trouve souvent dans les deltas et les zones inondables.

Fond géochimique: Composition chimique d'un sol et des roches dont il est issu. On distingue le fond géochimique naturel, qui résulte uniquement de la composition de la roche mère, du fond d'origine anthropique qui correspond aux éléments introduits dans le sol par les activités humaines.

FT Facteur de translocation : concentration en Cu dans les parties aériennes rapportée à celle dans les racines.

**Gley**: Les sols à gley sont de type hydromorphe, c'est-à-dire à engorgement prolongé par de l'eau avec pour conséquence des phénomènes de réduction du fer donnant à ces sols des couleurs bleu-vert gris.

**Hormèse**: Phénomène dose-réponse où une faible dose entraîne une stimulation et une forte dose, un effet inhibiteur.

**Inceptisol**: Sol peu différencié à dominante brune, riches en oxydes de fer en profondeur, riche en humus à la superficie.

**Mollisol**: Désigne la partie d'un cryosol qui, contrairement au pergélisol, gèle en hiver et dégèle en été. Les Mollisols sont une présentation des sols dans la taxinomie pédologique des États-Unis. Ils se forment dans des régions semi-arides à semi-humides, habituellement sous un couvert de pâturage.

**Phytoextraction**: Accumulation dans la plante de contaminants présents dans les sols et/ou les eaux. Ces contaminants s'accumulent dans les racines et/ou les parties aériennes des plantes.

#### Publications de référence

- 1 Agreste. 2006. http://www.agreste.agriculture.gouv.fr
- 2 **Brun LA, Maillet J,** *et al.* Relationships between extractable copper, soil properties and copper uptake by wild plants in vineyard soils. *Environ Poll* 1998;**102**:151-161.
- 3 **Baize D.** Eléments traces dans les sols. Fonds géochimiques, fonds pédogéochimiques naturels et teneurs agricoles habituelles: définitions et utilités. *Courrier de l'environnement de l'INRA* 2009;**57**: 63-72.

- 4 **Ruyters S, Salaets P, et al.** Copper toxicity under established vineyards in Europe: A survey. Sci Tot Environ 2013;**443**:470-477.
- 5 **Codex**. Codex alimentarius commission, Joint FAO/WHO general standard for contaminants and toxins in foods. 1998.
- 6 Angelova VR, Babrikov TD *et al.* Bioaccumulation and distribution of lead, copper, and cadmium in crops of *Solanaceae* family. *Communications in Soil Science and Plant Analysis 2009*;**40**:2248-2263.
- 7 **WBR**. World reference base for soil resources. A framework for international classification, correlation, and communication. World soil resources report 2006 103 (2<sup>nd</sup> edn.). IUSS Working Group WRB. Food and agriculture organization of the United Nations (FAO), Rome.
- 8 **USEPA**. Ecological soil screening levels for copper. Interim Final. U. S. Environmental Protection Agency: Washington DC 2007.

### Autres publications identifiées dans la période de veille

1 **Tiecher TL, Ceretta CA** *et al.* The potential of Zea mays L. in remediating copper and Zinc contaminated soils for grapevine production. *Geoderma 2016*;**262**: 52-61. Cet article montre que la toxicité pour le maïs du Cu présent dans les sols viticoles n'est pas augmentée par la présence de Zn (tous deux issus de fongicides). Le maïs pourrait donc être utilisé en phytoremédiation.

#### Liens d'intérêts :

X Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt



Connaître, évaluer, protéger

# ulletin -cientifique

Édition scientifique • Bulletin de veille n° 29 • Septembre 2016 Notes d'actualité scientifique

**Pathologies** 

## Exposition au radon dans les habitations et risque de cancer

Période: août 2015 à novembre 2015

Hélène BAYSSON | helene.baysson@irsn.fr

Institut de radioprotection et de sûreté nucléaire - Laboratoire d'épidémiologie - Fontenay aux Roses - France

Mots clés : cancer de la peau, cancer du poumon, non-fumeurs, radon

Il est reconnu que la qualité de l'air à l'intérieur de nos habitations a des effets non négligeables sur notre santé. La diversité des polluants, parfois non suspectés ou bien difficilement mesurables, rend la problématique relativement complexe. Le radon, gaz radioactif d'origine naturelle, est un des polluants de l'air intérieur les mieux étudiés. De nombreuses études épidémiologiques menées en milieu professionnel (chez les mineurs d'uranium) et en population générale ont permis de montrer que le principal risque pour la santé associé à l'exposition au radon est le développement d'un cancer du poumon. Cependant des questions restent en suspens par rapport à l'existence d'autres risques pour la santé liés à l'exposition au radon et par rapport aux types his tologiques de cancers du poumon et au délai d'apparition après exposition. Dans ce contexte, deux études récentes apportent des résultats nouveaux. L'article de Braüner et al. présente les résultats d'une étude épidémiologique (de type cohorte) évaluant le risque de cancer de la peau lié à l'exposition domestique au radon. L'article de Torres-Duran et al. présente les résultats d'une étude épidémiologique (de type cas-témoins) évaluant le risque de cancer du poumon lié à l'exposition domestique au radon en incluant uniquement des sujets non-fumeurs.

### Exposition au radon domestique et incidence de cancer de la peau dans une cohorte prospective au Danemark

**Braüner EV, Loft S, Sorensen M** *et al.* Residential radon exposure and skin cancer incidence in a prospective Danish cohort. Plos One 2015; 10(8)

#### Résumé

Les voies respiratoires et les poumons sont les principales voies de pénétration du radon dans l'organisme. Néanmoins, des études dosimétriques indiquent qu'une fraction de la dose due au radon et à ses descendants radioactifs peut être délivrée en dehors des poumons, en particulier à la moelle osseuse et à la peau (Kendal, 2002). Dans ce contexte, l'étude de Braüner et al. vise à évaluer l'existence d'une relation entre exposition domestique au radon et cancer de la peau. Les données issues de la cohorte prospective nationale « Alimentation, cancer et santé » sont utilisées. Cette cohorte, décrite dans (Tjonneland, 2007) est constituée de 57053 participants, âgés de 50 à 64 ans et inclus sur la période 1993-97. Un questionnaire autoadministré permet de collecter des données relatives à la santé, au mode de vie et au niveau d'éducation des participants. Des questions concernant la présence de grains de beauté et de taches de rousseur sont également posées. Des informations sont obtenues concernant les adresses présentes et passées des participants sur la période 1971-2011 grâce au système d'enregistrement civil danois. Les concentrations de radon dans chacune des habitations occupées sont estimées grâce à l'utilisation d'un modèle statistique prédictif qui utilise neuf variables explicatives telle que la localisation géographique, la géologie et les caractéristiques du logement. Pour chacune des habitations occupées, l'exposition solaire aux ultraviolets est également prise en compte à partir des données de l'institut météorologique danois qui fournit pour chacune des 8 régions du pays un nombre moyen d'heures d'ensoleillement par jour pour chaque mois. Les cas de cancer incidents de la peau sont obtenus via le registre de cancer national sur la période 1978 -2011. Les analyses statistiques sont réalisées grâce à un modèle de Cox\*, ajusté sur l'âge, le sexe, la possibilité de réaction cutanée à une forte exposition solaire, la présence de grains de beauté et de taches de rousseur (aucune, faible, modérée ou élevée), l'index de masse corporelle, le niveau d'éducation et le niveau socioéconomique, l'ensoleillement moyen de la région d'habitation, les activités physiques et le fait d'avoir occupé une profession « de plein-air » pendant au moins un an.

Au total, l'analyse statistique a porté sur 51445 participants, suivis pendant 13,6 années en moyenne. L'âge moyen à l'inclusion est de 56,3 ans. Les femmes représentent 52,6% de la population étudiée. La médiane des concentrations de radon prédites est de 38,3 Bq/m<sup>3</sup>. Au total, 3243 cas de BCC (carcinome basocellulaire), 317 cas de SCC (carcinome épidermoïde) et 329 cas de MM (mélanome malin) ont été diagnostiqués. Après ajustement sur les variables citées cidessus, les risques relatifs pour une augmentation de 100 Bq/m³ de l'exposition au radon étaient de 1,14 (Intervalle de confiance à 95% = [1,03;1,27]), de 0,90 (IC à 95% =[0,70;1,37]) et 1,08 (IC à 95%=[0,77;1,50]) respectivement pour l'incidence de BCC, SCC et MM. La relation entre l'exposition au radon et l'incidence de BCC était plus marquée pour les femmes comparativement aux hommes, pour les personnes résidant dans des zones géographiques de niveau socio-économique plus élevé (RR=1,31, IC à 95% =[1,15; 1,48]) comparativement aux personnes résidant dans des zones géographiques de niveau socio-économique moins élevé (RR=1,09, IC à 95% =[0,98; 1,22]) et pour les personnes résidant dans des appartements (RR=1,86, IC à 95% =[1,54; 2,26]) par rapport à celles résidant dans des maisons individuelles (RR=1,05 , IC à 95% =[0,91; 1,20]). Les auteurs concluent que leurs résultats sont en faveur d'une relation statistiquement significative entre le risque de BCC et l'exposition au radon. Néanmoins ils ne peuvent pas écarter la possibilité d'un biais de confusion\* résiduel relatif à l'exposition solaire ni conclure à une relation causale entre l'exposition au radon et l'incidence de BCC.

#### Commentaire

Les auteurs montrent une association statistiquement significative entre l'exposition domestique au radon et l'incidence de BCC (carcinome basocellulaire). Auparavant, seules des études de type écologique avaient observé une association entre l'exposition domestique au radon et le risque de NMSC (cancers de la peau non mélanomes). Une des forces de l'étude danoise est de croiser des données issues de recensement nationaux permettant de retracer l'historique résidentiel des participants, d'évaluer leur exposition au radon et aux ultraviolets et enfin de connaître l'incidence de cancers dans la population suivie. Du fait de l'absence de mesures directes de la concentration de radon dans les habitations présentes et passées des participants, l'exposition au radon des participants a été prédite à partir de modèles. L'évaluation rétrospective de l'exposition aux ultraviolets est également peu précise. Il en est de même pour l'évaluation par auto-questionnaire de la fréquence de grains de beauté et de taches de rousseur. Il est d'ailleurs à noter que cette étude de cohorte n'était pas spécifiquement conçue pour étudier l'association entre exposition domestique au radon et risque de cancer de la peau puisqu'elle fait partie d'un projet de recherche plus large sur le thème « Alimentation, cancer et santé ». Le nombre élevé de relations statistiques étudiées a pu aboutir à une association fortuite. Il est en effet attendu que les niveaux de concentrations de radon soient moins élevés dans les appartements que dans les maisons individuelles. Un biais de confusion résiduel par rapport à la prise en compte de l'exposition aux ultraviolets peut également limiter la portée des résultats observés.

## Exposition domestique au radon et caractéristiques des cancers du poumon chez les non-fumeurs.

**Torres-Duran M, Ruano-Ravina A, Parente-Lamelas I.** Residential radon and lung cancer characateristics in never smokers. International Journal of Radiation Biology 2015;91 (8):605-10.

#### Résumé

L'étude de Torres-Duran et al. vise à évaluer le risque de cancer du poumon lié à l'exposition au radon pour différent types histologiques de cancer et en fonction de l'âge au diagnostic. Pour cela une étude cas témoins a été réalisée chez les non-fumeurs dans les régions à fortes concentrations de radon situées au Nord-Ouest de l'Espagne. Les sujets non-fumeurs ont été recrutés au sein de différents hôpitaux entre le mois de Janvier 2011 et Octobre 2013. Au total 216 cas de cancers du poumon (histologiquement

vérifié) et 329 témoins ont été inclus dans l'étude. Les participants ont été interviewés en face à face au sujet de leur mode de vie, leurs occupations professionnelles, leur alimentation, leur consommation d'alcool, et enfin leur exposition au tabagisme passif. Des mesures de concentration de radon ont été effectuées dans l'habitation actuelle de chaque participant grâce à un détecteur passif installé pendant au minimum trois mois. Les mesures de radon ont été réalisées pour 92,1% des cas et pour 83,5% des témoins. La durée médiane d'occupation de l'habitation était respectivement de 30 années et 36 années chez les cas et chez les témoins. La relation exposition / risque a été étudiée au moyen de régressions logistiques avec ajustement sur l'âge, le sexe et le fait d'avoir vécu avec un fumeur pendant au moins 20 années. Les odd-ratios de cancer du poumon chez les non-fumeurs exposés à plus de 200 Bq/m<sup>3</sup> étaient le double de ceux observés chez les nonfumeurs exposés à moins de 200 Bg/m<sup>3</sup>. Ces résultats étaient observés quel que soit le type histologique de cancer du poumon. Cependant les risques relatifs étaient statistiquement significatifs seulement pour les cas de cancers de type histologique adénocarcinome (OR= 2,19 IC 95% = [1,44; 2,33]. L'exposition au radon était plus élevée chez les cas de cancers diagnostiqués avant 50-60 ans comparativement aux cas de cancers diagnostiqués à un âge plus avancé (différence non statistiquement significative). Les auteurs concluent que l'exposition au radon est associée à un risque de cancer du poumon chez les non-fumeurs quel que soit le type histologique, bien que les résultats observés ne soient significatifs que pour le type adénocarcinome. En outre, Les auteurs suggèrent qu'une exposition à des concentrations élevées de radon serait associée à un âge au diagnostic plus faible, suggérant un « effet cumulatif » de l'exposition au radon chez les non-fumeurs. Néanmoins, ils soulignent que l'étude est confrontée à un manque de puissance statistique (peu de cas non-fumeurs âgés de moins de 60 ans et de type non adénocarcinome).

#### Commentaire

Dans l'étude de Torres-Duncan et al, les cancers du poumon sont le plus fréquemment de type « adénocarcinome » ce qui est concordant avec les caractéristiques observées dans d'autres études épidémiologiques portant sur les facteurs de risque de cancer du poumon chez les non-fumeurs. La relation exposition au radon - risque est uniquement statistiquement significative pour ce groupe histologique de cancer probablement en raison du faible nombre de cas dans les autres groupes histologiques. Dans l'étude conjointe européenne (Darby, 2005) et dans l'étude conjointe nordaméricaine (Krewsky, 2006), les risques les plus élevés étaient observés pour les cancers du poumon à petites cellules mais ces études portaient à la fois sur des fumeurs et des non-fumeurs. Dans l'étude de Torres-Duncan et al, l'exposition au radon était plus élevée pour les cas de cancers diagnostiqués avant 50 ans comparativement aux cas de cancers diagnostiqués à un âge plus avancé, ce qui laisserait supposer selon les auteurs que, chez les nonfumeurs, le niveau de l'exposition au radon serait un facteur de risque plus important que la durée d'exposition au radon. A ce jour, cette hypothèse n'a pas été validée pas d'autres

L'étude de Torres-Duncan et al. est basée sur un nombre relativement élevé de cas de cancer du poumon, diagnostiqués chez des non-fumeurs. La population est caractérisée par une faible mobilité géographique ce qui justifie le choix de ne mesurer la concentration de radon que dans l'habitation actuelle de chaque participant, Le biais de sélection des cas et des témoins est réduit car la population d'étude bénéficie d'une « couverture universelle de soins » et les cas de cancer du poumon sont généralement diagnostiqués au sein des hôpitaux participant à l'étude. Cependant cette étude a une puissance statistique limitée en raison du faible nombre de cas de cancers diagnostiqués avant 60 ans ou ayant une histologie différente d'adénocarcinome. En outre, il aurait été intéressant de mener des analyses statistiques de sensitivité par exemple en sélectionnant uniquement les sujets ayant résidé plus de 20 ans dans leur habitation actuelle et/ou pour d'autres groupes d'exposition au radon (dans l'article, les sujets ont été répartis dans deux groupes d'exposition uniquement :  $<200 \text{ Bq/m}^3 \text{ et } >=200 \text{ Bq/m}^3)$ 

#### **C**ONCLUSION GÉNÉRALE

Le radon, gaz radioactif d'origine naturelle, est présent dans l'air intérieur des habitations mais à des concentrations variables, dépendant de la richesse en uranium et en radium des sous-sols, du mode de ventilation, du type d'habitation et du matériau de construction. L'exposition au radon représente près de la moitié de l'exposition totale aux rayonnements ionisants de la population générale. Les voies respiratoires et les poumons sont les principales voies de pénétration du radon dans l'organisme. Néanmoins, des études dosimétriques indiquent qu'une part de la dose due au radon et à ses descendants radioactifs peut être délivrée en dehors des poumons, en particulier à la moelle osseuse et à la peau (Kendal, 2002). De nombreuses études épidémiologiques menées en milieu professionnel (chez les mineurs d'uranium) et en population générale ont permis de montrer que le radon est un cancérigène pulmonaire. En dehors des études écologiques, l'étude de Brauner et al est la première étude épidémiologique à évaluer directement le risque de cancer de la peau associé à l'exposition domestique au radon. Les auteurs observent une relation statistique significative entre l'exposition et le risque de BCC (carcinome basocellulaire) qui correspond à la forme la plus fréquente de cancer de la peau. Cependant, en raison de limites méthodologiques, les auteurs ne peuvent pas conclure à une relation de causalité et d'autres recherches seront nécessaires pour confirmer ou infirmer ces résultats. Chez les non-fumeurs, l'exposition au radon est le principal facteur de risque de cancer du poumon. Les résultats de l'étude de Torres-Duncan et al, menée chez les nonfumeurs, montrent que la relation exposition - risque est observée pour tous les types histologiques de cancer du poumon, bien que la relation ne soit statistiquement significative que pour les adénocarcinomes. Dans cette étude l'âge au diagnostic serait inversement corrélé au niveau d'exposition au radon (i.e. les niveaux d'exposition au radon les plus élevés ont été observés chez les cas diagnostiqués à un âge plus jeune). D'autres études, caractérisées par une plus grande puissance statistique, sont nécessaires pour valider ces hypothèses.

#### **GENERAL CONCLUSION**

Radon is a natural radioactive gas that tends to accumulate indoor with concentrations levels depending on the geological type of sub-soils, ventilation habits, type of building and material of construction. Radon exposure represents nearly half of the total radiation exposure of the general population. Radon is mainly delivered in the body through the airways and lungs. Dosimetric studies indicate that a part of the dose due to radon can be delivered to the bone marrow and to the skin (Kendal, 2002). Numerous epidemiological studies carried out in occupational settings (among uranium miners) and in the general population have shown that radon is a lung carcinogen. Apart from ecological studies, the study of Brauner et al is the first epidemiological study to directly assess the skin cancer risk associated with residential radon exposure. The authors observe a statistically significant relationship between exposure and risk of basal cell carcinoma. However, due to methodological limitations, the authors cannot conclude that the observed relationship is causal, and further research is needed to confirm these results. In non-smokers, radon exposure is the main risk factor for lung cancer. The results of the study by Torres Duncan et al, carried out among neversmokers, show that the association between radon exposure and lung cancer is observed for all histological types of lung cancer, although the relation is only statistically significant for adenocarcinomas. In this study, age at diagnosis is inversely correlated to radon exposure (ie the highest radon exposure levels have been observed in cases diagnosed at a lower age). Further studies with a higher statistical power, are needed to confirm these findings.

#### Lexique

Biais de confusion: désigne une erreur systématique de l'estimation d'une mesure d'association (odds ratio ou risque relatif) entre le facteur étudié et la maladie, du fait de l'existence d'un facteur de confusion. Il est possible de prendre en compte a posteriori un biais de confusion au moment de l'analyse des données.

Modèle de Cox: méthode de régression multivariée au même titre que les modèles de régression logistique ou de régression linéaire, qui consiste à modéliser le phénomène que l'on étudie, c'est-à-dire la variable Y (variable dépendante) caractérisant l'événement par une fonction de plusieurs autres variables X (variables indépendantes) caractérisant les facteurs de risque et de confusion potentiels. Ce modèle permet la prise en compte simultanée de plusieurs variables pour expliquer la survenue d'un événement en tout ou rien.

#### Publications de référence

**Kendall G.M., Smith T.J.**: Doses to organs and tissues from radon and its decay products. *Journal of Radiological Protection*, 2002: 389-406.

**Darby S., Hill D., Auvinen A.**, Barros-Dios J.M., Baysson H., Bochicchio F. et *al*: Radon in homes and risk of lung cancer: collaborative analysis of individual data from 13 European case-control studies. *British Medical Journal*, 2005; **330**:223-227.

**Krewski, D., Lubin, J.H., Zielinski, J.M.,** *et al.*, A combined analysis of North American case—control studies of residential radon and lung cancer. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. Part A, 2006; **69**, 533—597.

Wheeler BW, Allen J, Depledge MH *et al.* Radon and skin cancer in southwest England: an ecologic study. *Epidemiology*, 2012, **23**: 44-52

Wheeler BW, Kothencz G, Pollard AS. Geography of non-melanoma skin cancer and ecological associations with environmental risk factors in England. *Br J Cancer*; 2013, 109:235-241

IARC, International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on the evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, vol 43, Man –made Mineral Fibres and Radon. Lyoon France: International Agency for Research and Cancer, 1988.

**Tjonneland A, olsen A, Boll K** *et al.* Study design, exposure variables, and socioeconomic determinants of participation in Diet, Cancer and Health: a population-based prospective cohort study of 57,053 men and women in Denmark. Scan J Public Health, 2007;**35**:432-441

### Revues de la littérature parues dans la période de veille

**Kitahara CM, Linet MS, Ntowe E, Berrington de Gonzalez AB**. A new era of low-dose radiation epidemiology. Curr Envir Rpt 2015, **2**:236-239.

#### Autres publications identifiées

**Hunter N, Muirhead C, Bochicchio F, Haylock R**. Calculation of lifetime lung cancer risks associated with radon exposure, based on various models and exposure scenarios. J Radiol Prot; 2015, **35**: 539-555.

Des calculs de risque (vie entière) de cancers du poumon sont effectués en considérant plusieurs modèles de risque et suivant plusieurs scénarios d'exposition pour les fumeurs actifs, les ex-fumeurs et les non-fumeurs. Ces modèles de risque sont issus des études épidémiologiques menées chez les mineurs d'uranium (études de cohorte et étude castémoins nichées) et des études épidémiologiques cas-témoins menées en population générale. Pour une exposition égale à 200 Bq/m³, les estimations de risque obtenues varient entre 2,98 et 6,55% pour les fumeurs et entre 0,19 et 0,42% pour les non-fumeurs.

**Peckham EC, Scheurer ME, Danysh HE** *et al.* Residential radon exposure and incidence of childhood lymphoma in Texas, 1995-2011.

Cette étude de type écologique est basée sur l'observation de 2147 cas de lymphomes diagnostiqués chez des enfants, au Texas, sur la période 1995-2011. Les cas incidents de lymphomes ont été recensés via le registre de cancers du Texas. Les régions de résidence des cas, au moment du diagnostic, ont été classées en «niveaux de radon moyenfaible », « niveaux de radon moyen-élevé » et « niveaux de radon élevé » à partir des données issues de la campagne de mesure du radon effectuée au Texas. Les auteurs n'observent pas d'association positive entre l'exposition au radon dans les habitations et la survenue de lymphomes.

#### Liens d'intérêts :

### Risque de leucémie chez l'enfant résidant à proximité des routes à fort trafic

Période : septembre 2015 à novembre 2015

Andrea LASSERRE | alasserre@institutcancer.fr

Institut national du cancer - Département prévention, Pôle santé publique et soins - Boulogne-Billancourt - France

Mots clés : benzène, cancer pédiatrique, émission de véhicules, géolocalisation, leucémie, pollution de l'air, trafic automobile

Les leucémies sont les cancers pédiatriques les plus fréquents en France, avec 470 nouveaux cas par an (1). Certains facteurs de risque sont établis (exposition prénatale aux rayons X, exposition à la radiothérapie et chimiothérapie, prédispositions génétiques), cependant, ils n'expliquent que peu de cas (2, 3). Différents facteurs environnementaux sont suspectés dans le développement de la leucémie : l'exposition aux pesticides, aux basses fréquences près des lignes à haute tension, à la consommation de tabac par le père pendant la grossesse et aux émissions du trafic routier. Les émissions des véhicules automobiles, contribuent à la pollution de l'air, dont différents composants sont des cancérogènes du groupe 1\*: gaz d'échappement des véhicules diesel, benzo(a)pyrène, benzène et 1,3-butadiène. Ces deux derniers sont connus pour leur lien causal avec la leucémie myéloblastique de l'adulte dans le cadre d'expositions professionnelles (4). Les concentrations en polluants des émissions du trafic automobile sont très importantes à proximité immédiate des routes, et diminuent graduellement en s'éloignant, pour se disperser au-delà de 500 mètres. En Europe, environ 10 % de la population réside à moins de 500 m d'une route à fort trafic (5). Une revue systématique de la littérature et méta-analyse récente regroupe des études évaluant le lien entre la proximité du domicile aux routes à fort trafic et la survenue de leucémies pédiatriques (6). Deux articles sont parus ce dernier trimestre, renforçant cette hypothèse. Le premier article rapporte les résultats d'une étude cas-témoin française sur l'incidence des leucémies chez les enfants résidant à proximité des routes à grande circulation. Le deuxième article analyse auprès d'une vaste cohorte suisse l'association entre l'incidence des leucémies et la proximité de la résidence au trafic automobile.

## Leucémie chez l'enfant vivant à proximité des routes à fort trafic : exposition au benzène. Etude GEOCAP, 2002-2007.

Houot J, Marquant F, Goujon S, Faure L, Honoré C, Roth MH, Hémon D, Clavel J. Residential Proximity to Heavy-Traffic Roads, Benzene Exposure, and Childhood Leukemia-The GEOCAP Study, 2002-2007. *Am J Epidemiol* 2015;**182** (8):685-93.

#### Résumé

L'étude cas-témoin française GEOCAP\* vise à analyser les causes environnementales des cancers pédiatriques et notamment le lien entre des facteurs environnementaux dont l'exposition résidentielle à la pollution automobile et le risque de leucémie chez l'enfant. Le recrutement des cas s'est fait à partir du registre national des hémopathies malignes de l'enfant (RNHE\*). Ainsi, la totalité des cas de leucémie infantile diagnostiqués en France métropolitaine entre 2002 et 2007 ont été inclus : 2275 cas de leucémie aiguë lymphoblastique (LAL\*) et 418 cas de leucémie aiguë myéloïde (LAM\*). Les témoins, un échantillon représentatif de la population infantile française de 30 000 enfants a été constitué par l'Insee\* (7). Le lieu de résidence de chacun des enfants a été géo-localisé de façon anonyme et sans connaissance du statut cas ou témoin. Les expositions ont été évaluées par la proximité du domicile au trafic routier, et par la longueur cumulée des tronçons routiers autour du domicile. Ces niveaux d'exposition ont été décidés à partir d'un modèle de dispersion de la pollution de l'air autour des routes (8). Les concentrations de dioxyde d'azote (NO<sub>2</sub>\*) ont été modélisées par l'Ademe\*. Pour l'Ile-de-France, les concentrations de benzène ont été fournies par AIRPARIF\*. Pour les habitations très proches du trafic, les concentrations de benzène ont été évaluées sur le réseau routier en utilisant les flux de circulation annuelle et des données de modélisation autour des routes. Les sujets ont été classés en fonction de leur exposition au benzène : <1,3 µg/m<sup>3</sup> (exposition médiane des témoins) ou ≥1,3 μg/m³. En Ile-de-France, l'exposition au NO2 a été catégorisée en deux concentrations <35  $\mu$ g/m<sup>3</sup> et  $\geq$  35  $\mu$ g/m<sup>3</sup>. La fréquence des LAM\* est 30 % plus élevée chez les enfants habitant dans un rayon inférieur à 150 m des routes à fort trafic et lorsque la longueur cumulée des tronçons routiers dans ce rayon dépasse 256 m (OR $^*$  1,3 IC $_{95\%}^*$  1,0-1,8). En revanche, il n'y avait pas d'association entre les LAL et la distance et/ou la longueur cumulée des routes à fort trafic au voisinage des habitations. La survenue de LAM ou de LAL n'a pas été trouvée associée avec la concentration de NO2. En Ile-de-France, une concentration de benzène égale ou supérieure à 1,3 μg/m³ est associée à la survenue de LAM (OR 1,6 IC<sub>95%</sub> 1,0-2,4), notamment chez les enfants dont l'habitat était le plus exposé au trafic, c'est à dire vivant avec au moins 260 m de routes à fort trafic à moins de 150 m du domicile, et dont la concentration movenne annuelle en benzène au voisinage de la résidence était supérieure à la valeur médiane observée en Ile-de-France (OR 2,2 IC $_{95\%}$  1,1-4,7).

#### Commentaire

L'étude GEOCAP a mis en évidence une augmentation du risque de LAM chez les enfants avec la longueur des routes à fort trafic dans un rayon de 150 m de leur domicile, notamment chez ceux habitant en Ile-de-France, où il est montré que l'exposition au benzène liée au trafic automobile pourrait être l'une des explications de cette association. Cette association n'est pas observée pour les cas de LAL, qui est la leucémie la plus fréquente chez l'enfant (80 % des cas). Une de forces de GEOCAP est la disponibilité des données exhaustives de qualité à partir d'un registre national. Cette étude a été conçue pour éviter les biais de sélection par l'inclusion de tous les cas à partir du RNHE qui localise leurs adresses au moment du diagnostic, et en dérive l'exposition à la source environnementale soupçonnée d'induire une augmentation du risque de cancer. Une autre force de l'étude est l'inclusion d'un grand nombre de témoins, géocodés selon la même procédure que les cas pour prévenir les biais de sélection. La distance aux routes est mise à jour sans faire appel à la mémoire des parents, ce qui réduit le risque de recueil d'information déclarative, aussi bien pour les cas que pour les témoins. Cependant, la géolocalisation ne concerne que la résidence au moment du diagnostic. L'exposition prénatale et la résidence entre la naissance et le diagnostic ne sont pas recueillies, ce qui pourrait être source d'erreur pour un enfant fortement exposé par le passé. Une autre limite de l'étude est l'absence d'information sur les habitudes de vie, les expositions à l'intérieur des logements et le statut tabagique des parents. Mais les auteurs considèrent peu probable que la relation soit liée à d'autres facteurs de risque connus car les facteurs potentiels devraient être spécifiques à la LAM et plus prévalents dans les lieux à fort trafic. Il serait intéressant d'explorer si la distance et la longueur des tronçons routiers sont des marqueurs d'inégalités sociales. Les auteurs auraient pu ajuster les données sur un indicateur de déprivation sociale. Une étude cas-témoins précédente conduite par la même équipe avait trouvé une association entre le trafic automobile et la leucémie aigüe chez les enfants résidant à moins de 500 m des routes et en lien avec des fortes concentrations de NO<sub>2</sub> pour LAM et LAL (9). Il s'agissait d'une étude menée par des entretiens qui a donc pu comporter des biais de déclaration, et dont le nombre de cas et de témoins était moins important (763 cas et 1681 témoins). GEOCAP, avec une méthode plus robuste, apporte des nouvelles informations. Les enfants franciliens (les seuls pour lesquels l'exposition au benzène était disponible) exposés à un très important trafic routier et à une concentration de benzène supérieure à la médiane sont plus à risque de développer une LAM. Vue la complexité de la composition particulaire des émissions automobiles, et de l'air en ville, il paraît difficile d'attribuer cet excès de risque au seul benzène.

#### Cancer chez l'enfant vivant à proximité des tronçons autoroutiers : étude de cohorte suisse à échelle nationale

Spycher BD, Feller M, Röösli M, Ammann RA, Diezi M, Egger M, Kuehni CK. Childhood cancer and residential exposure to highways: a nationwide cohort study. *Eur J Epidemiol* 2015;**23** (3):203-21.

#### Résumé

L'objectif de cette étude était d'évaluer le lien entre l'exposition au trafic automobile autoroutier à proximité du domicile et le cancer pédiatrique. Une vaste cohorte de tous les enfants de moins de 16 ans a été constituée à partir de deux recensements de la population suisse (1990 et 2000) constituant la base de la cohorte nationale suisse (CNS<sup>12</sup>). Les enfants ont été suivis depuis leur naissance jusqu'à fin 2008. Les cas incidents de tous les cancers -leucémies, LAL, lymphomes, tumeurs du système nerveux central (SNC\* et tous autres cancers)- ont été identifiés dans le registre suisse de cancers de l'enfant (RSCE<sup>13</sup>). Les deux bases des données, CNS et RSCE, ont été croisées pour identifier les cas incidents. L'exposition aux émissions des véhicules a été estimée en termes de distance entre la résidence (au moment du recensement et du diagnostic) et l'autoroute la plus proche, et par le nombre de voitures et camions circulants (volume du trafic). Le volume moyen de trafic d'un jour de semaine de 2005 a été utilisé comme référence d'exposition. L'incidence de cancer a été étudiée en analysant l'exposition au moment du recensement (modèle de Cox\*) et au moment du diagnostic (densité d'incidence ). Pour le modèle de Cox, le suivi a commencé en 1990 et s'est arrêté si l'enfant avait un diagnostic de cancer, atteignait l'âge de 16 ans, émigrait, décédait ou à la fin du suivi administratif en 2008. Ce modèle a inclus 2 096 402 enfants, dont 1783 cas de cancers (dont 532 leucémies, 326 lymphomes et 420 tumeurs du SNC<sup>14</sup>). Cette analyse a montré une association non-significative avec la leucémie (RR 1,43 IC<sub>95%</sub> 0,79-2,61). L'analyse de densité d'incidence par régression de Poisson a inclus tous les cas de cancer diagnostiqués entre 1985 et 2008 (dont 1367 leucémies, 574 lymphomes et 890 tumeurs du SNC). Les analyses ont été ajustées sur le sexe, l'âge et l'année au diagnostic. Les enfants habitant à moins de 100 m de l'autoroute avaient plus de risque (RR 1,57 IC $_{95\%}$  1,09-2,25) de développer une leucémie, notamment une LAL (1,64 IC95% 1,10-2,43) que ceux à 500 m ou plus. Ce risque était accru chez les moins de 5 ans (RR 1,92 IC<sub>95%</sub> 1,22-3,04 pour leucémie, et, 1,94 IC<sub>95%</sub> 1,18-3,20 pour LAL). Le risque de survenue de cancer (tous types confondus) était plus important chez les enfants de moins de 5 ans vivants à moins de 100m d'une autoroute (RR 1,54 IC<sub>95%</sub> 1,13-2,11). Aucune association significative n'est trouvée chez les plus âgés. Parmi les enfants vivant à moins de 500 m d'une route, le risque de survenue de lymphomes (RR 1,14 IC<sub>95%</sub> 1,04-1,25) augmente de façon significative avec le nombre de voitures (pour 10 000 véhicules additionnels/jour). La leucémie et les tumeurs du SNC n'ont pas montré de lien avec le volume du trafic. L'interaction entre le volume du trafic et la distance à la route la plus proche n'a pas montré de lien avec le développement du

#### Commentaire

Cette étude menée sur une vaste cohorte suisse a montré une association entre la proximité de la résidence des routes à grande vitesse et le développement de leucémie et de LAL chez des enfants, notamment ceux de moins de cinq ans résidant à 100 m ou moins. Cette étude utilise des données existantes dans différentes bases de données nationales exhaustives, mises à jour de façon systématique et continue, ce qui permet de réduire le biais de sélection. Les registres de cancers sont exhaustifs, cependant, pour tenir compte des éventuelles différences dans l'enregistrement entre les cantons suisses, les analyses d'incidence ont été répétées en ajustant sur les cantons sans trouver de différence. Aussi, la géolocalisation des résidences était complète pour 98,5 % des enfants. Un autre avantage de la cohorte a été la possibilité de tenir compte de la modernisation du réseau routier en modifiant le statut d'exposition de l'enfant au cours du suivi. Pour les enfants enregistrés dans les deux recensements (1990 et 2000) avec deux adresses différentes, la dernière résidence a été prise en compte s'il y avait résidé pour plus de cinq ans. Pour réduire le risque d'erreur de classification dû aux changements d'adresse, les chercheurs ont analysé un sous-groupe d'enfants qui ont eu une résidence identique au moins les cinq années avant leur entrée dans la cohorte, qui montre des résultats similaires. Cette étude a été ajustée sur plusieurs facteurs de confusion (niveau d'urbanisation, niveau socio-économique du quartier, niveau d'études du chef de famille, nombre de personnes par foyer, nationalité, radiations ionisantes environnementales, distance aux lignes de haute tension les plus proches et force de champs électromagnétiques). Certaines limites méritent néanmoins d'être discutées. Dans cette étude, la proximité de la résidence à des tronçons routiers autres qu'autoroutiers n'a pas été analysée. Cependant, les données ont été ajustées au degré d'urbanisation ce qui pourrait corriger les émissions liées aux grandes villes. L'analyse réalisée en tenant compte de la résidence au moment du recensement est une force car elle est antérieure au diagnostic ce qui accroît le risque de ne pas mettre en évidence une relation et pourrait expliquer la relations plus marquée chez les enfants de moins de 5 ans (moins de déménagement, estimation plus précise). Cependant, et même si l'association n'est pas statistiquement significative pour cette analyse, elle a la même tendance que dans l'analyse de densité. Une limite est que l'année de référence d'exposition au trafic en termes de volume (2005) ne correspond pas à la durée totale du suivi (1985-2008) et suppose que le volume du trafic est constant dans le temps. La distance domicile-route, comme proxy de l'exposition, ne permet pas de distinguer entre les polluants individuels (monoxyde de carbone, dioxyde d'azote, particules ultrafines, benzène, hydrocarbures aromatiques polycliniques). Une augmentation du risque chez les plus petits enfants, pourrait indiquer qu'ils sont plus vulnérables aux expositions environnementales. Cette relation a été décrite dans quelques études, mais elle ne fait pas l'unanimité. Les auteurs décrivent une relation dose-réponse avec la distance aux routes prise comme variable linéaire, avec des RR\* supérieurs à 1 à moins de 100 m, et une diminution du risque entre 300-500 m qui peut s'expliquer

par les dispositifs muraux anti-bruit qui modifient les courants aériens des polluants.

#### **C**ONCLUSION GÉNÉRALE

Les leucémies sont les cancers les plus fréquents chez l'enfant. Différents facteurs environnementaux sont suspectés dans leur développement. Les deux articles analysés, décrivent une association positive entre la proximité à des routes à fort trafic et la survenue de leucémie pédiatrique. Le premier article, met en évidence un lien significatif de survenue de LAM chez les enfants vivants à moins de 150 m des tronçons à fort trafic, avec un sur-risque chez les enfants franciliens. Le deuxième article, mené sur une vaste cohorte suisse a montré une association entre la proximité à des routes à grande vitesse et le développement de leucémie et de LAL chez des enfants, notamment ceux de moins de cinq ans et vivant à moins de 100 m des routes à fort trafic.

La possibilité que l'exposition résidentielle à la circulation des enfants en bas âge soit associée à un risque de leucémie infantile, est une information à inclure dans les messages de prévention destinés au grand public, mais surtout aux professionnels responsables des services d'urbanisme et de planification des villes et des transports. Ces données confortent la nécessité de mesures visant à réduire l'exposition de la population aux émissions de véhicules. L'exposition résidentielle à la circulation pourrait être réduite en minimisant le développement de bâtiments à forte densité près des autoroutes et des artères d'agglomérations très fréquentées. Aussi, pour harmoniser les différents objectifs de santé publique, la promotion des moyens de transport alternatif, et l'accroissement du réseau de transport en commun non polluant devraient être intensifiés.

#### **GENERAL CONCLUSION**

Leukemia is the most common cancer in children. Several environmental factors are suspected to induce its development. Both articles show an increased risk of childhood leukemia associated with high road traffic exposure. The first article shows an increased incidence of acute myeloblastic leukemia in children living at 150 m from a high road, and the association was reinforced with children living in Ile-de-France. The second article found an association with acute lymphoblastic leukemia, in children living close to highways, especially those aged less than 5 years old.

The possibility that residential exposure to traffic is associated with an increased risk of childhood leukemia can inform precautionary health messages targeted to the general population and professionals responsible for community and public transport design. The professionals of Public health need to include public health goals when promoting alternative transport and non-polluting public transit network.

#### Lexique

**Ademe** : Agence de l'environnement et de la Maitrise de l'Energie

Airparif: Association indépendante créée en 1979, et agréée par le ministère Ministère de l'Environnement pour la surveillance de la qualité de l'air sur l'ensemble de l'Ile-de-France.

Cancérogène pour l'homme est une des classifications du CIRC. Groupe 1: cancérogène pour l'homme; Groupe 2A: probablement cancérogène pour l'homme; Groupe 2B: peut-être cancérogène pour l'homme; Groupe 3: inclassable quant à sa dangerosité pour l'homme; Groupe 4: probablement non cancérogène pour l'homme. Etablie par des experts internationaux, cette classification n'a pas de caractère réglementaire mais apporte des informations utiles à l'évaluation pour de nombreux agents, en particulier ceux non répertoriés par la classification européenne.

**CNS** : cohorte nationale suisse : plateforme qui regroupe des données de naissance, socio-économiques, géo localisation du domicile, migration et mortalité

**Densité d'incidence**: nombre de nouveaux cas de cancer pour une période (t) divisé par la somme de personne-temps à risque pendant la période t. Cela suppose de connaître la population à risque et le nombre de cas survenus pour chaque période de temps.

**GEOCAP**: Etude cas-témoins basée sur la Géolocalisation des Cancers Pédiatriques, qui s'inscrit dans un programme de recherche sur les causes environnementales chez l'enfant de moins de 15 ans en France métropolitaine.

IC95%: L'intervalle de confiance (IC) à 95 % est un intervalle de valeurs qui ont une probabilité de 95 % de contenir la vraie valeur du paramètre estimé.

**Insee**: Institut national de la statistique et des études économiques

LAL: leucémie aiguë lymphoblastique

LAM: leucémie aiguë myéloïde

Modèle de Cox: méthode de régression multivariée au même titre que les modèles de régression logistique ou de régression linéaire, qui consiste à modéliser le phénomène que l'on étudie, c'est-à-dire la variable Y (variable dépendante) caractérisant l'événement par une fonction de plusieurs autres variables X (variables indépendantes) caractérisant les facteurs de risque et de confusion potentiels. Ce modèle permet la prise en compte simultanée de plusieurs variables pour expliquer la survenue d'un événement en tout ou rien.

NO₂: dioxyde d'azote

NO<sub>x</sub>: oxydes d'azote

**OR**: Odds ratio, ou rapport de chances: correspond à la mesure statistique permettant d'évaluer l'association entre une exposition (ici le trafic automobile) et un effet (ici la leucémie).

**RNHE**: Registre national des hémopathies malignes de l'enfant (RNHE)

RR: Risque relatif: Mesure le risque de survenue d'un événement (ici la leucémie) chez les enfants exposés par rapport à ceux non exposés au facteur d'intérêt (ici le trafic automobile).

RSCE : registre suisse des cancers de l'enfant

SNC : système nerveux central

#### Publications de référence

- 1 Institut national du cancer. 2015. Les cancers en France, édition 2014. Collection Etat des lieux et des connaissances. Boulogne-Billancourt. http://www.lesdonnees.e-cancer.fr/
- 2 **Spector LG**. Genetic and nongenetic risk factors for childhood cancer. *Pediatr Clin North Am* 2015; **62**(1):11-25.
- 3. **Wiemels J**. New insights into childhood leukemia etiology. *Eur J Epidemiol* 2015;**30**(12):1225-7.
- 4 IARC. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human. Vol. 100 F: chemicals agents and related occupations; 2012; 628 pages. http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/PDFs/index.ph p
- 5 **Entec.** Development of a methodology to assess population exposed to high levels of noise and air pollution close to major transport infrastructure. Final report for the European Commission; 2006: 131 pages. http://ec.europa.eu/environment/air/transport/pdf/final\_re port\_main.pdf.
- 6 **Boothe V, Boehmer T, Wendel A** *et al.* Residential Traffic Exposure and Childood Leukemia. *Am J Prev Med* 2014; **46**(4): 413-22.

- **7 Semarge-Faure C, Laurier D, Goujon-Bellec S** *et al.* Childhood leukemia around French nuclear power plants—the GEOCAP study, 2002-2007. *Int J Cancer* 2012;**131**(5):E769-E780.
- 8 Fisher P, Hoek G, Van Reeuwijk H, et al. Traffic-related differences in outdoor and indoor concentrations of particles and volatile organic compounds in Amsterdam. Atmos Environ 2000; 34(22): 3713-3722.
- 9 Amigou A, Semarge-faure C, Orsi L, et al. Road traffic and childhood leukemia: the ESCALE study. Environ Health Perspect 2011; 119(4):566-572.

### Autres publications identifiées dans la période de veille :

1 Filippini T, Heck JE, Malagoli C, et al. A review and metaanalysis of outdoor air pollution and risk of childhood leukemia. J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev 2015;33(1):36-66.

Les chercheurs ont fait une revue de la littérature et conduit une méta-analyse sur l'évaluation de l'association entre la pollution atmosphérique liée au trafic ( $NO_2$  et benzène) et le risque de leucémie infantile. Le lien est confirmé, aussi bien pour la LAL ( $NO_2$ ) que la LAM (benzène) et est plus important pour cette dernière.

2 Carlos-Wallace FM, Zhang L, Smith MT, et al. Parental, In Utero, and Early-Life Exposure to Benzene and the Risk of Childhood Leukemia: A Meta-Analysis. Am J Epidemiol 2016;1;183(1):1-14.

Les auteurs on fait une méta-analyse d'études épidémiologiques ayant trait à l'exposition des parents au benzène et autres solvants en milieu professionnel/domestique et la leucémie chez l'enfant. La survenue de leucémie infantile serait en association avec l'exposition au trafic routier et plusieurs indicateurs d'exposition au benzène surtout chez la mère. Le risque existe aussi bien pour la LAL que la LAM et est plus marqué pour cette dernière.

3 Malagoli C, Malavolti M, Costanzini S, et al. Increased incidence of childhood leukemia in urban areas: a population-based case-control study. *Epidemiol Prev* 2015;**39**(4 Suppl 1):102-107.

Il s'agit d'une étude cas-témoins basée sur la population pour évaluer la possibilité d'un excès de risque de leucémie infantile dans les zones urbaines, indépendamment de la pollution du trafic routier. Après ajustement pour le benzène et les particules, un risque est retrouvé pour l'urbanisation et l'habitat à proximité de décharges et sites de construction.

4 Raaschou-Nielsen O, Ketzel M, Harbo Poulsen A, *et al.* Traffic-related air pollution and risk for leukaemia of an adult population. *Int J Cancer* 2016;**138**(5):111-7.

Une vaste étude danoise, cas-témoins, met en évidence une association statistiquement significative entre l'exposition à long terme à la pollution de l'air liée à la circulation automobile ( $NO_x$  et  $NO_2$ ) à proximité du domicile et le risque de leucémie myéloïde aiquë chez l'adulte.

#### Liens d'intérêts :

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt

# Conséquences cérébrales d'une exposition néonatale au pesticide chlorpyrifos chez le rat.

Période : septembre 2015 à novembre 2015

Agnès PETIT-PAITEL | paitel@ipmc.cnrs.fr

CNRS - Institut de pharmacologie moléculaire et cellulaire - UMR7275 - Valbonne - France

Mots clés: amygdale, cerveau, chlorpyrifos, cytokines, insecticide, microglie, neuroinflammation, neurotoxicité, organophosphoré, pesticides

Le chlorpyrifos (CPF) est un insecticide organophosphoré (OPP) à usage agricole et/ou domestique pour les pays qui n'en ont pas interdit l'usage (la France a interdit l'usage domestique depuis 1995). Le CPF est considéré comme étant modérément toxique par voies orale et respiratoire. Le CPF, comme les autres OPP, est un inhibiteur irréversible des cholinestérases, ce qui est conduit à la plupart de ses effets toxiques. Chez l'homme, il existe deux cholinestérases qui diffèrent par leur origine, leur lieu de synthèse et leurs fonctions physiologiques: l'acétylcholinestérase (AChE) et la butyrylcholinestérase (BChE). L'AChE est présente dans la membrane des globules rouges, au niveau des jonctions neuromusculaires et au niveau du cerveau, dans les synapses chimiques de type cholinergique. La BChE est synthétisée dans le foie et retrouvée dans le plasma et dans certains tissus périphériques. L'exposition aux OPP induit une accumulation de l'acétylcholine (ACh) au niveau des systèmes nerveux central et périphérique, ce qui entraîne une hyperstimulation des récepteurs cholinergiques à l'origine d'une détresse respiratoire aiguë, de perturbations cardiovasculaires et de troubles neurologiques\*. Dans le cerveau, des études ont montré que la neurotoxicité du CPF impliquerait un stress oxydatif, la peroxydation lipidique et des dommages de l'ADN\*. La toxicité neurodéveloppementale du CPF ne concernerait pas que les systèmes cholinergiques mais toucherait également les systèmes de transmission monoaminergique, dont le système dopaminergique\*. Le premier article sélectionné ici traite des effets d'une exposition néonatale au CPF sur les neurones dopaminergiques de jeunes rats. Le second article démontre qu'une exposition néonatale au CPF induirait une neuroinflammation dans l'amygdale de jeunes rats, une zone cérébrale associée aux émotions.

## Une exposition néonatale au chlorpyrifos induit la perte des neurones dopaminergiques chez les jeunes rats adultes.

Zhang J, Dai H, Deng Y, Tian J, Zhang C, Hu Z, Bing G, Zhao L. Neonatal chlorpyrifos exposure induces loss of dopaminergic neurons in young adult rats. *Toxicology 2015*;336:17-25.

#### Résumé

La maladie de Parkinson (MP) est une maladie neurodégénérative caractérisée par la mort progressive des neurones dopaminergiques de la substance noire (SN). Les substances toxiques environnementales, en particulier les pesticides, sont suspectées de favoriser la survenue des formes sporadiques de MP\*. Parmi ces pesticides figure le chlorpyrifos (CPF). L'exposition humaine au CPF serait quotidienne et se ferait par voie respiratoire, digestive et cutanée. Les effets neurologiques d'une telle exposition font l'objet de différentes études. L'exposition au CPF durant le développement entraînerait des perturbations cognitives et comportementales\*. Le CPF n'affecterait pas uniquement le système de neurotransmission cholinergique mais toucherait également les systèmes noradrénergique, dopaminergique et sérotoninergique\*. Le but de la présente étude est d'examiner si une exposition au CPF chez les jeunes rats pourrait induire une perte des neurones dopaminergiques à l'âge adulte. Les rats ont reçu des injections sous-cutanées quotidiennes de CPF (5mg/kg) du 11<sup>eme</sup> au 14<sup>eme</sup> jour après la naissance (correspondant à la période périnatale chez l'Homme). Dès 16 jours après le traitement, le nombre de neurones dopaminergiques est significativement diminué dans la SN des rats traités. Après 46 jours, la réduction du nombre de ces neurones s'est accrue. De plus, dès 12h après le traitement au CPF, une activation des cellules microgliales et une prolifération des astrocytes sont observées dans le SN des rats. Ces altérations sont transitoires; l'activation microgliale n'est plus observable au 16 eme jour posttraitement et le nombre d'astrocytes, bien que plus élevé qu'en conditions contrôles, est proche de la normale. 12h, 24h et 72h après l'exposition au CPF, une activation de NFκB et de la MAP-kinase p38 est observée, suggérant une activation des voies inflammatoires. Globalement, les résultats indiquent qu'une exposition courte à une dose considérée comme sub-toxique de CPF chez les rats jeunes provoque rapidement des effets de type pro-inflammatoire dans le cerveau et induit à l'âge adulte une diminution importante du nombre de neurones dopaminergiques dans la SN.

#### Commentaire

Cette étude, bien qu'uniquement descriptive, démontre qu'une exposition courte et transitoire à des doses considérées comme faibles (5mg/kg) de CPF chez les rats jeunes suffit à provoquer des altérations cérébrales à court (activation gliale) et long terme (perte des neurones dopaminergiques de la SN). Il est regrettable qu'aucun comarquage n'ait été réalisé pour identifier les cellules dans lesquelles les voies inflammatoires sont mises en jeu. Les auteurs proposent des liens causaux entre les différents éléments observés (le CPF induirait une activation gliale qui provoquerait une neuroinflammation et la mort subséquente des neurones dopaminergiques de la SN), toutefois l'interdépendance des événements reste purement hypothétique.

## Effet de HMGB1 sur la neuroinflammation induite par une exposition sub-toxique de chlorpyrifos dans l'amygdale de rats néonataux.

Tian J, Dai H, Deng Y, Zhang J, Li Y, Zhou J, Zhao M, Zhao M, Zhang C, Zhang Y, Wang P, Bing G, Zhao L. The effect of HMGB1 on sub-toxic chlorpyrifos exposure-induced neuroinflammation in amygdala of neonatal rats. *Toxicology 2015*; **338**:95-103.

#### Résumé

L'exposition à de faibles doses de CPF durant le développement cérébral des induirait défauts neurodéveloppementaux tels que la baisse du quotient intellectuel\*, des troubles de déficit de l'attention\*, la baisse de la mémoire de travail et une augmentation de l'incidence de l'anxiété\* et des troubles du spectre autistique\*. L'amygdale est une zone cérébrale impliquée dans différentes tâches cognitives dont la mémorisation, l'apprentissage et les réactions émotionnelles. Le CPF administré à une dose de 20mg/kg pendant 10 jours à des rattes gestantes engendrerait la destructuration de l'amygdale chez les rats nouveau-nés. De plus, des altérations de l'amygdale peuvent provoquer anxiété et dysfonctionnement cognitif chez les jeunes. Ici, les auteurs examinent si des doses sub-toxiques de CPF administrées à de jeunes rats pourraient causer une neuroinflammation dans l'amygdale. Les jeunes rats ont reçu des injections souscutanées quotidiennes de CPF (5mg/kg) du 11<sup>eme</sup> au 14<sup>eme</sup> jour après la naissance. 12h après traitement et de manière plus marquée à 72h, l'expression d'Iba-1 (marqueur microglial) est augmentée dans l'amygdale des rats traités et la morphologie de la microglie est modifiée, suggérant une activation microgliale par le CPF. L'expression de HMGB1 (High Mobility Group Box 1) est augmentée dans l'amygdale dès 24h après traitement au CPF, et sa localisation subcellulaire est modifiée. Parallèlement, l'expression du TLR-4\* est augmentée dans l'amygdale dans rats traités au CPF. Ceci s'accompagne d'une augmentation des ARN messagers et des protéines des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et TNF $\alpha$ . Le pré-traitement à la glycyrrhizine bloque l'activation et la translocation nucléaire du NF- $\kappa B$  ainsi que l'augmentation des cytokines pro-inflammatoires induites par le CPF. Globalement ces résultats indiquent qu'un traitement court à des doses considérées comme subtoxiques de CPF induisent une inflammation mettant probablement en jeu la voie HMGB1/TLR-4/NF-κB dans l'amygdale des jeunes rats.

#### Commentaire

Ici, les auteurs montrent que l'administration de doses faibles de CPF durant 4 jours consécutifs à de jeunes rats cause une inflammation dans l'amygdale des rats. Les résultats suggèrent, sans toutefois le démontrer, que la neuroinflammation provoquée par le CPF mettrait en jeu une voie de signalisation impliquant HMGB1, TLR-4 et NF-κB aboutissant à la production de cytokines pro-inflammatoires. L'interdépendance des différents éléments mis en évidence n'est pas démontrée. De plus, des études de co-localisation auraient permis d'apporter la preuve que les cellules microgliales étaient bien les acteurs de la neuroinflammation induite par le CPF. Enfin, étant donné que le choix de l'amygdale est justifié par son rôle dans l'anxiété, il aurait été intéressant de mener des études comportementales afin d'évaluer les conséquences à moyen et long terme du CPF administré pendant la période périnatale sur l'anxiété et la gestion des émotions des rats adultes.

#### **CONCLUSION GÉNÉRALE**

En raison de son utilisation très répandue, l'exposition à des niveaux sub-toxiques de CPF pourrait être un danger pour la santé publique. En effet, les rats exposés à ces doses de CPF présentent des changements morphologiques dans le cerveau, ainsi que des effets néfastes à long terme sur la fonction synaptique, le développement et le comportement.

Bien que descriptives, les deux études présentées ici ont l'intérêt de démontrer de manière assez convaincante qu'une exposition courte (quatre jours) à des doses considérées comme faibles (5mg/kg/jour) de CPF chez des rats en période périnatale suffit à provoquer une réaction inflammatoire significative dans différentes zones cérébrales, de manière rapide (dès 12h) et durable. La réaction inflammatoire observée dans la substance noire et l'amygdale impliquerait une activation des cellules microgliales, qui, bien que cela n'ait pas été démontré, pourrait rendre les individus exposés dans leur jeunesse plus susceptibles de développer certaines maladies neurodégénératives et/ou troubles psychiatriques. En effet, le CPF pourrait d'une part favoriser la mort des neurones dopaminergiques et donc la survenue de la MP et d'autre part pourrait rendre les individus plus susceptibles à des désordres émotionnels en raison des altérations dans l'amygdale. Ces conclusions sont malheureusement très spéculatives car les preuves formelles de telles conséquences à l'âge adulte ne sont pas apportées mais ces études permettent tout de même de démontrer le manque d'innocuité vis-à-vis du cerveau des doses faibles de CPF. Il convient toutefois de noter que les valeurs toxicologiques de référence du CPF pour les usages phytopharmaceutiques en Europe ont fait l'objet d'une réévaluation en 2014 et que les doses prises en compte pour les établir sont inférieures à la dose testée dans ces deux publications. La dose testée de 5mg/kg/jour représente dix fois la dose sans effet néfaste observé qui est prise en compte pour une exposition unique et cinquante fois la dose sans effet néfaste observé, prise en compte pour une exposition répétée. De ce fait les recommandations européennes semblent protectrices. L'administration d'une dose inférieure à celles induisant une inhibition des cholinestérases érythrocytaires, aurait permis d'évaluer si les effets neurologiques observés peuvent être mis en évidence en l'absence d'effet anti-cholinestérasique. De plus, l'inclusion de plusieurs doses dans le protocole aurait permis une caractérisation d'une éventuelle relation dose-réponse.

#### **GENERAL CONCLUSION**

Due to its widespread use, exposure to subtoxic levels of chlorpyrifos (CPF) might be a commonly encountered health hazard. Rats exposed to subtoxic doses of CPF show morphological changes in the brain, as well as longterm adverse effects on synaptic function/development and behavioral performance. Although descriptive, the two studies presented here, conducted by the same team, are of interest to demonstrate that a short exposure (4 days) of CPF at low doses (5mg/kg/day) during the perinatal period of rats, are sufficient to cause a significant inflammatory response in different brain areas, i.e substantia nigra and amygdala, rapidly (from 12hrs) and lasting over several days. The observed inflammatory reaction in the substantia nigra and amygdala involve activation of microglial cells, which, although this has not been demonstrated, could make individuals exposed in their youth more likely to develop certain neurodegenerative diseases and/or psychiatric disorders at adulthood. Indeed, the CPF could on one hand promote death of dopaminergic neurons and thus increase the occurrence of the Parkinson disease and could also make individuals more susceptible to emotional disorders due to changes in the amygdala. These findings are unfortunately very speculative because the formal proof of such consequences in adulthood is not made, and these studies point out the lack of safety of low doses of CPF towards the brain. It should however be noted that reference values for CPF toxicity for plant protection practices in Europe were revalued in 2014 and that the doses taken into account in the set are less than the dose tested in both publications. The tested dose of 5mg/kg/day represents ten times the dose without observed adverse effect taken into account for a single exposure and 50 times the dose without observed adverse effect considered for repeated exposure. Therefore the European recommendations seem to be protective. The administration of a dose lower than the one inducing inhibition of erythrocyte cholinesterase would have help in assessing whether the observed neurological effects may be seen in the absence of anti-cholinesterase effect. Furthermore, the inclusion of multiple doses in the protocol would have permitted a characterization of a possible dose-response relationship.

#### Lexique

Acétylcholine (ACh): Neurotransmetteur qui transmet l'information d'un neurone à un autre et permet ainsi la propagation d'un potentiel d'action (influx électrique) dans le système nerveux. En périphérie, l'ACh a pour principaux effets une dilatation des artères, une contraction des bronches et du tube digestif et une sécrétion de mucus par les bronches. Dans le cerveau, l'ACh aurait plusieurs fonctions dont la régulation de la motricité, perturbée dans

la maladie de Parkinson, ou la mémoire, perturbée dans la maladie d'Alzheimer.

**Astrocytes**: Autres cellules gliales du système nerveux central. Ils assurent un rôle de soutien et de structure, ont un rôle de capture des neurotransmetteurs au niveau des synapses et participent à la barrière hémato-encéphalique. Ils ont aussi un rôle de transport de molécules et d'approvisionnement des neurones en lactate.

Amygdale: Structure cérébrale essentielle au décodage des émotions, et en particulier des stimuli menaçants pour l'organisme. L'amygdale est impliquée notamment dans les troubles anxieux.

Cellules microgliales (ou microglie): Elles appartiennent aux cellules gliales. Petites et fortement ramifiées, elles sont très mobiles et patrouillent en permanence avec leurs prolongements cellulaires le parenchyme cérébral. Fonctionnellement proches des macrophages périphériques, elles ont pour rôle d'assurer l'immunité du système nerveux et jouent également un rôle important dans la maturation des synapses. En réaction avec des changements dans leur environnement, les cellules microgliales peuvent adopter différents phénotypes d'activation et devenir des médiateurs de l'inflammation en sécrétant différentes cytokines et chimiokines.

Cholinestérase: Enzyme qui catalyse la réaction d'hydrolyse d'un ester de la choline (acétylcholine, butyrylcholine) en choline et en acide acétique. En physiologie, cette réaction est nécessaire pour permettre aux récepteurs cholinergiques de revenir à leur état de repos après activation. Il existe deux types de cholinestérases, qui se distinguent par leur affinité pour l'acétylcholine et la butyrylcholine: l'acétylcholinestérase (AChE) et butyrylcholinestérase (BChE) ou cholinestérase plasmatique.

**Glycyrrhizine**: Molécule issue des racines de réglisse, qui inhibe l'activité de HMGB1.

High Mobility Group Box 1 (HMGB1): Protéine qui joue un rôle crucial dans l'amplification de la réponse inflammatoire, l'établissement de la réponse immunitaire et la réparation tissulaire. La protéine HMGB1 dans le milieu extracellulaire serait également capable d'agir comme une cytokine proinflammatoire et contribuerait ainsi à la pathogenèse de différentes maladies qu'elles soient d'origine inflammatoire ou infectieuse.

Interleukine-6 (IL-6) et Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ): Cytokines pro-inflammatoires impliquées dans l'inflammation aigüe et chronique et qui jouent également le rôle de messager entre les cellules impliquées dans ce processus, notamment les cellules microgliales.

Neurotoxicité: Toxicité au niveau des neurones.

**Neurotransmission monoaminergique**: Transmission de l'influx nerveux par le biais de neurotransmetteurs de la famille des monoamines parmi lesquelles on distingue notamment les catécholamines (dopamine, noradrénaline et adrénaline) et les tryptamines (sérotonine). Une baisse des monoamines serait impliquée dans différents troubles

psychiatriques qui incluent la dépression, l'anxiété et la schizophrénie.

**Organophosphoré** (OPP): Qualifie une molécule organique de synthèse (notamment certains insecticides) qui contient au moins un atome de phosphore. Plus biodégradables et d'action plus spécifique que les organochlorés, les OPP leur sont préférés malgré leur coût supérieur.

**Peroxydation lipidique**: Phénomène d'oxydation des lipides insaturés qui se produit *in vitro* (à l'origine du rancissement des aliments) et in vivo selon un même mécanisme. In vivo, elle est responsable de dommages tissulaires dus à la formation de radicaux libres lors du processus de peroxydation.

Stress oxydatif: Conséquence du fonctionnement cellulaire des organismes qui consomment de l'oxygène, aboutissant à la production de radicaux libres. En cas d'excès, il peut devenir dommageable et causer inflammation et dommages de l'ADN favorisant la survenue de cancers ou de maladies neurodégénératives par exemple.

**Substance noire**: Petite zone du cerveau dont les neurones sécrètent la dopamine, un neurotransmetteur (substance permettant aux messages de circuler entre les neurones) permettant de réguler les mouvements.

**Synapse cholinergique**: Synapse du système nerveux central ou périphérique qui utilise l'acétylcholine (ACh) comme neurotransmetteur, pour transmettre l'information nerveuse d'un neurone au suivant.

**Toll-like Receptor** (TLR): Protéines transmembranaires impliqués dans la reconnaissance de composants microbiens et dans la morphogenèse. La voie de signalisation impliquant les TLRs aboutit à l'activation de la protéine NF- $\kappa$ B, qui est impliquée dans de nombreux processus cellulaires comme la prolifération, l'apoptose ou la réponse inflammatoire. HMGB1 pourrait interagir avec TLR-2 et -4.

#### Publications de référence

- 3 Aldridge JE, Meyer A, Seidler FJ, et al. Alterations in central nervous system serotonergic and dopaminergic synaptic activity in adulthood after prenatal or neonatal chlorpyrifos exposure. Environ Health Perspect 2005;113:1027-31.
- 4 Moretto A, Colosio C. The role of pesticide exposure in the genesis of Parkinson's disease: epidemiological studies and experimental data. *Toxicology* 2013;**307**:24-34.
- 5 **London L, Beseler C, Bouchard MF** *et al.* Neurobehavioral and neurodevelopmental effects of pesticide exposures. *Neurotoxicology* 2012;**33**:887-96.
- 6 Aldridge JE, Levin ED, Seidler FJ, et al. Developmental exposure of rats to chlorpyrifos leads to behavioral alterations in adulthood, involving serotonergic mechanisms and resembling animal models of depression. *Environ Health Perspect* 2005;**113**:527-31.

- 7 **Bouchard MF, Chevrier J, Harley KG** *et al.* Prenatal exposure to organophosphate pesticides and IQ in 7-year-old children. *Environ Health Perspect* 2011;**119**:1189-95.
- 8 Marks AR, Harley K, Bradman A *et al.* Organophosphate pesticide exposure and attention in young Mexican-American children: the CHAMACOS study. *Environ Health Perspect* 2010;**118**:1768-74.
- 9 Rauh V, Arunajadai S, Horton M *et al.* Seven-year neurodevelopmental scores and prenatal exposure to chlorpyrifos, a common agricultural pesticide. *Environ Health Perspect* 2011;**119**:1196-201.
- 10 **Venerosi A, Ricceri L, Rungi A,** *et al.* Gestational exposure to the organophosphate chlorpyrifos alters social-emotional behaviour and impairs responsiveness to the serotonin transporter inhibitor fluvoxamine in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 2010;**208**:99-107.
- 11 **Shelton JF, Geraghty EM, Tancredi DJ** *et al.* Neurodevelopmental disorders and prenatal residential proximity to agricultural pesticides: the CHARGE study. *Environ Health Perspect* 2014;**122**:1103-9.
- 12 Mullins RJ, Xu S, Pereira EF *et al.* Prenatal exposure of guinea pigs to the organophosphorus pesticide chlorpyrifos disrupts the structural and functional integrity of the brain. *Neurotoxicology* 2015;**48**:9-20.

### Autres publications identifiées dans la période de veille

**Lee I, Eriksson P, Fredriksson A,** *et al.* Developmental neurotoxic effects of two pesticides: Behavior and biomolecular studies on chlorpyrifos and carbaryl. *Toxicol Appl Pharmacol* 2015;**288**:429-38.

Les auteurs montrent qu'une dose unique de deux pesticides, le chlorpyrifos et le carbaryl, administrée à des souriceaux au pic de croissance et de maturation cérébrale, suffit à provoquer des effets développementaux toxiques qui engendreraient des déficits d'apprentissage et de mémorisation à l'âge adulte, de manière indépendante des effets cholinerqiques.

**Rauh VA, Garcia WE, Whyatt RM, et al.** Prenatal exposure to the organophosphate pesticide chlorpyrifos and childhood tremor. *Neurotoxicology* 2015;**51**:80-86.

Les résultats de cette étude montrent que les enfants soumis à une forte exposition prénatale au chlorpyrifos seraient significativement plus susceptibles de présenter des tremblements légers à modérés d'un ou des deux bras lors d'une évaluation réalisées entre les âges de 9 et 13,9 ans.

**Slotkin TA, Skavicus S, Seidler FJ.** Prenatal drug exposures sensitize noradrenergic circuits to subsequent disruption by chlorpyrifos. *Toxicology* 2015;**338**:8-16.

Cette étude indique qu'un traitement prénatal à la nicotine ou à la dexaméthasone chez la mère gestante sensibilise les circuits noradrénergiques de la descendance à des dommages ultérieurs par le chlorpyrifos, fournissant ainsi une preuve de principe que les expositions chimiques fœtales qui touchent la population humaine peuvent augmenter la vulnérabilité ultérieure à des substances toxiques environnementales communément rencontrées.

#### Liens d'intérêts :

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt



# Dulletin Connaître, évaluer, protéger

cientifique

Édition scientifique • Bulletin de veille n° 29 • Septembre 2016 Notes d'actualité scientifique Outils et méthodes

## Validation de biomarqueurs d'exposition à la pollution de l'air

Période : septembre 2015 à novembre 2015

Sylvain BILLET | sylvain.billet@univ-littoral.fr

Université du Littoral Côte d'Opale - UCEIV EA4492, Unité de chimie environnementale et interactions sur le vivant – Dunkerque - France

Mots clés : air exhalé, air intérieur, biomarqueur, exposition, particules fines, pollution atmosphérique, toxicité

La pollution atmosphérique constitue un problème mondial de santé publique, responsable de plus de 7 millions de morts en 2012 selon l'Organisation mondiale de la santé. La présence de toxiques aériens gazeux ou particulaires est responsable d'un accroissement de la morbidité (ex. pneumonie, athérosclérose, broncho-pneumopathie chronique obstructive) et de la mortalité (ex. cancer pulmonaire). L'exposition ne peut toutefois pas être quantifiée rapidement ou à moindre coût. D'intenses recherches sont actuellement menées afin d'identifier d'une part les mécanismes de toxicité des polluants atmosphériques (c.-à-d. en identifiant des biomarqueurs d'effet), et d'autre part des marqueurs biologiques permettant de caractériser l'exposition des populations à ces toxiques (c.-à-d. biomarqueurs d'exposition). Un biomarqueur efficace doit pouvoir se substituer au mesurage physico-chimique de l'exposition et si possible permettre d'intégrer la chronicité de cette exposition. Selon Rylance et al. (2013), le biomarqueur idéal devrait être à la fois étroitement associé à l'exposition, suffisamment sensible et spécifique, dans des populations hétérogènes, économiquement viable, acceptable pour la population (e.g. peu invasif), et mesurable sur le terrain. Les études toxicologiques, qu'elles soient in vitro, in vivo ou menées en population, proposent chaque année de nouveaux marqueurs biologiques potentiellement intéressants et correspondant relativement bien à ces critères. Suite à leur découverte, une étape fondamentale correspond à la validation à la fois du biomarqueur en population exposée d'une part, mais également de sa méthode d'analyse.

Alors que la pollution de l'air extérieur est de plus en plus étudiée, l'OMS souligne que la pollution de l'air intérieur, moins documentée, cause la mort d'environ 4,3 millions de personnes dans le monde chaque année. Cette exposition est d'autant plus importante dans les pays en développement, où l'utilisation de combustibles solides pour la préparation des repas, entraîne des émissions massives de polluants gazeux et particulaires. L'évaluation de cette exposition requiert des méthodes analytiques spécifiques onéreuses. Il est par conséquent nécessaire de développer des approches à faible coût. Alison Lee et al. ont réalisé une étude transversale au Bangladesh chez des femmes exposées à la pollution de l'air intérieur afin de valider le monoxyde de carbone exhalé comme marqueur d'exposition à l'aide d'une mesure simple et peu onéreuse.

Parmi les polluants atmosphériques, les particules fines constituent un défi par leurs propriétés complexes aux niveaux physique et chimique, mais également pour leur métrologie et la caractérisation de l'exposition des populations humaines. Ces particules ont pourtant été classées cancérogènes certains pour l'homme par le Centre International de recherche sur le cancer en 2013 (Loomis et al., 2013). Parmi les biomarqueurs en cours de développement, la détermination de la charge particulaire des macrophages alvéolaires (MA) apparaît comme prometteuse. Toutefois, sa mesure peut nécessiter la réalisation de prélèvements invasifs qui ne sont pas compatibles avec la démarche d'évaluation des risques en santé publique. Hannah Jary et ses collaborateurs ont ainsi étudié l'applicabilité de la détermination de la charge particulaire des MA dans les expectorations induites, qui sont moins invasives que de procéder à des lavages broncho-alvéolaires. Cette étude met toutefois en évidence les difficultés d'analyse par imagerie des échantillons collectés.

#### Validation de la mesure de CO exhalé comme biomarqueur de l'exposition récente à la pollution de l'air intérieur lors d'une étude transversale

Lee A, Sanchez TR, Shahriar MH, Eunus M, Perzanowski M, Graziano J. A cross-sectional study of exhaled carbon monoxide as a biomarker of recent household air pollution exposure. Environ Res. 2015; 143 (A): 107-11.

#### Résumé

La préparation des repas est une cause majeure de pollution de l'air intérieur au Bangladesh. Lee et ses collaborateurs ont conduit une étude transversale de l'impact de cette pollution sur la santé respiratoire de 28 femmes. L'évaluation de l'exposition a été estimée d'une part via un questionnaire sur

le nombre de repas préparés par jour, ainsi que les conditions de cuisson, et d'autre part via la mesure du monoxyde de carbone (CO) ambiant, dans la zone de respiration des femmes, pendant une journée complète. Cette dernière mesure est extrapolée au taux sanguin de carboxyhémoglobine par l'équation de Coburn, Forester et Kane (Coburn et al., 1965). Avant et après chaque préparation de repas, le taux de saturation en carboxyhémoglobine a été quantifié, par mesure du CO présent dans l'air exhalé. L'impact respiratoire a été identifié par questionnaire « Saint George's Respiratory » et mesuré par spirométrie. Enfin, des condensats d'air exhalé ont été recueillis, puis leur pH a été mesuré, afin de détecter une inflammation potentielle des voies respiratoires.

Deux tiers des femmes cuisinent trois fois par jour, la majorité le faisant dans un local clos (78%), avec du bois (57%). Le taux de saturation en carboxyhémoglobine exhalée montre une augmentation continue au cours de la journée, probablement liée à la présence de polluants dans l'atmosphère du domicile. Ce taux de carboxyhémoglobine a été corrélé avec les symptômes respiratoires décrits dans le questionnaire. Ainsi, l'essoufflement est l'atteinte la plus corrélée avec une élévation du taux de carboxyhémoglobine exhalée. Les marqueurs de pH des condensats et des tests de spirométrie n'ont pu montrer de résultats significatifs.

#### Commentaire

Le Bangladesh est l'un des pays les plus pauvres du monde. Sa population, notamment féminine, apparaît comme étant très exposée à la pollution de l'air intérieur causée par la combustion de bois et de charbon utilisés pour la préparation des repas. Outre les concentrations de polluants, la durée d'exposition est importante avec des moyennes comprises entre 4h20 (2 repas / jour) et 5h40 (3 repas / jour). L'impact sanitaire majeur de ces expositions justifie le développement de méthodes simples et peu onéreuses de caractérisation de l'exposition.

Le faible effectif de l'étude ne permet pas de valider de nouveaux biomarqueurs d'exposition à la pollution de l'air intérieur. Toutefois, certains résultats sont intéressants. Même si le taux de saturation en carboxyhémoglobine est globalement supérieur aux valeurs moyennes attendues pour une population non fumeuse, un accroissement de ce taux semblerait être consécutif à la préparation des repas. Chez les femmes qui préparent deux repas par jour, le petitdéjeuner dont la préparation est la plus longue (près de 2h30), entraîne ainsi une augmentation significative du taux saturation en carboxyhémoglobine L'augmentation continue de ce taux au cours de la journée n'est probablement pas causée uniquement par la préparation des repas, mais par une imprégnation globale. Le temps de ½ vie de la carboxyhémoglobine (2 à 6h) est également à considérer dans la validation d'un biomarqueur. Lee et al. montrent une diminution sensible de ce marqueur potentiel au cours de la nuit.

Les polluants présents dans l'air représentent un mélange extrêmement complexe de nature et de formes très différentes. L'homme est ainsi exposé en permanence à un cocktail de polluants. Lors d'enquêtes épidémiologiques, il est important de prendre en compte sinon d'éliminer les biais de confusion pouvant perturber l'interprétation des données. Lee et al. ont, de manière pertinente, cherché à éliminer les co-expositions aux polluants de l'air. Même si aucune mesure à l'extérieur du foyer n'a été réalisée, l'impact de la pollution liée au trafic routier a été limité en ne considérant que des femmes habitant des villages éloignés des routes principales. Toutefois, les auteurs n'ont pas précisé le niveau d'imprégnation tabagique des femmes, alors que la consommation de tabac est une cause importante d'augmentation de CO expiré (Al-Sheyab et al., 2015). Selon toute vraisemblance, la consommation de cigarettes reste négligeable, car selon les estimations, le tabagisme féminin bangladais est inférieur à 2%. Il aurait pu être intéressant de caractériser une éventuelle influence du tabagisme passif, ainsi que d'intégrer une population témoin non exposée à la combustion de cuisson. Un des atouts

majeurs de l'étude reste la comparaison avant et après la cuisson, qui réduit l'impact des biais.

L'exposition aux polluants de l'air intérieur est estimée par le nombre de repas préparés par jour, ainsi que par un suivi simultané de la concentration atmosphérique du CO. En revanche, d'autres toxiques de l'air intérieur aurait pu être également dosés, tels que les particules fines PM<sub>2.5</sub>, les oxydes d'azote (NO<sub>x</sub>), des composés organiques volatils (COV¹) ou des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP²) produits par la combustion du bois (Salthammer *et al.*, 2014).

Enfin, dans un contexte de caractérisation d'une pollution de l'air intérieur dans un pays en développement où le niveau d'éducation est limité, *a fortiori* dans la population féminine (4,4 années d'éducation dans le cas présent), l'applicabilité d'un protocole simple de mesure du taux de saturation en carboxyhémoglobine exhalée est vérifiée.

## Comparaison de deux méthodes d'analyse de l'expectoration induite pour utiliser la charge particulaire des voies respiratoires comme biomarqueur d'exposition à la pollution atmosphérique

Jary H, Rylance J, Patel L, Gordon SB, Mortimer K. Comparison of methods for the analysis of airway macrophage particulate load from induced sputum, a potential biomarker of air pollution exposure. BMC Pulm Med. 2015; 15: 137.

#### Résumé

Les particules fines de diamètre inférieur à 2,5 µm (PM<sub>2.5</sub>) sont capables de pénétrer profondément dans les poumons jusqu'aux alvéoles. Ces particules peuvent interagir avec les cellules du compartiment pulmonaire : pneumocytes, cellules de Clara, macrophages alvéolaires (MA). Ces derniers présentent une fonction majeure dans la protection du poumon profond vis-à-vis des contaminants particulaires : la phagocytose. La charge en particules des macrophages pourrait par conséquent fournir un biomarqueur d'exposition très intéressant. Toutefois, la méthode permettant sa détermination n'est pas encore validée. Les auteurs ont comparé la faisabilité de deux méthodes de quantification numérique de la charge particulaire des MA en recueillant 21 échantillons d'expectorations induites. Ce mode de recueil est privilégié car beaucoup moins invasif que le lavage broncho-alvéolaire. Après élimination du mucus, les cellules ont été fixées au méthanol sur trois lames de microscope. La première lame a servi à la numération cellulaire en vue d'éliminer les échantillons non conformes (rapport leucocyte/cellules épithéliales malpighiennes ≤ 5). Les deux autres lames ont été utilisées pour une détermination de la charge particulaire après marquage spécifique Hemacolor ou éosine et analysés respectivement par les deux logiciels ImageJ et Image SXM. Seuls 13 échantillons se sont révélés exploitables. Les auteurs ont estimé que la charge médiane de particules dans les macrophages alvéolaires représente 0,38 μm² (ImageJ) et qu'une surface moyenne de 4,0% des macrophages est occupée par des particules (image SXM). Toutefois aucune corrélation n'a été retrouvée entre les deux logiciels.

L'utilisation d'Image SXM nécessite deux fois plus de temps mais se révèle moins subjective que celle d'ImageJ qui nécessite un personnel bien formé.

#### Commentaire

La phagocytose exercée par les MA à l'encontre des particules fines inhalées pourrait fournir la possibilité d'un biomarqueur d'exposition aux PM<sub>2.5</sub>. En effet, la charge particulaire des MA est augmentée chez les personnes affectées par la pollution de l'air intérieur (Fullerton et al. 2009). La charge des MA est également associée à l'exposition aux PM chez les cyclistes exposés à la pollution urbaine (Nwokoro et al. 2012). Outre, ce rôle de biomarqueur d'exposition, la charge particulaire des MA pourrait expliquer une aggravation de la fonction pulmonaire et constituerait ainsi un biomarqueur d'effet. La méthode la plus efficace pour le prélèvement de MA reste le LBA. Cette technique présente un certain nombre d'inconvénients liés principalement à la réalisation d'une bronchoscopie et est susceptible d'entraîner des évènements indésirables, ce qui la rend incompatible avec une application de dépistage en santé publique environnementale. L'étude de Jary est intéressante car elle met en avant le possible recours à l'expectoration induite pour mesurer la charge particulaire. Cet examen est beaucoup moins invasif et présente à la fois plus de confort et de sécurité des participants tout en étant d'un faible coût et ne nécessitant pas de recours à un spécialiste. Toutefois, plus de la moitié des volontaires (28/49) n'a pas participé à l'étude. Chez les 21 participants, 19 échantillons d'expectoration induite ont été récupérés dont 13 satisfaisaient les critères de conformité (i.e. rapport leucocytes / cellules épithéliales ≥ 5).—Le nombre final d'échantillons exploitables limite la portée de l'étude en vue d'une validation méthodologique. Cette limite est confirmée par l'hétérogénéité morphologique des MA constatée par les auteurs. En effet, les résultats ne semblent pas totalement en accord avec la détermination par LBA. Ceci pourrait être expliqué par la provenance et la nature des MA récupérés. Les cellules collectées par expectoration induite sont issues des voies aériennes proximales. Les auteurs se proposent d'expliquer ces différences par la survenue d'un stress, voire d'une mort cellulaire par apoptose liée au protocole de recueil. Les participants ont été recrutés parmi des patients asthmatiques, ce qui pourrait augmenter très légèrement la rétention pulmonaire des particules inhalées. Le recours à cette population semble toutefois justifié par son accessibilité. Il est nécessaire que d'autres travaux, basés sur un plus grand nombre d'échantillons, affinent les méthodologies et évaluent la fiabilité inter et intraobservateur pour obtenir une méthode validée de diagnostic d'exposition à la pollution atmosphérique particulaire. Il est également important que la méthodologie proposée soit d'un coût modéré et applicable sans nécessiter un niveau de qualification supérieur.

#### **C**ONCLUSION GÉNÉRALE

L'utilisation des biomarqueurs est susceptible d'améliorer la recherche des effets sanitaires de la pollution de l'air en permettant l'évaluation de l'exposition, ce qui accroit la compréhension des mécanismes, et en ouvre la possibilité d'enquêter sur la susceptibilité individuelle. Bien que leur utilisation soit jugée pertinente en ce sens, l'intégration de biomarqueurs dans les études épidémiologiques des effets sur la santé des particules atmosphériques demeure rudimentaire. Plusieurs défis restent en effet à relever dans le processus de validation d'un biomarqueur. Celui-ci doit être mesurable à un niveau constant dans le corps alors que les expositions environnementales sont généralement irrégulières en termes d'intensité et de durée. Les marqueurs biologiques mesurés sont souvent fortement corrélés aux dernières expositions néfastes, et ne permettent pas d'évaluer le caractère chronique de l'exposition aux polluants atmosphériques. Les analyses de la littérature s'accordent sur la faible probabilité de l'existence d'un biomarqueur unique, mais plutôt sur l'utilité de déterminer un groupe de biomarqueurs pour intégrer à la fois les expositions à court et long terme. L'applicabilité et l'utilisation effective sur le terrain de ces biomarqueurs pertinents ne se vérifieront que si les méthodes de mesure sont en accord avec le caractère global de la pollution atmosphérique. A la fois les particularités de la population affectée et sa diversité au niveau mondial nécessitent le développement de méthodes simples, rapides et peu onéreuses de caractérisation de l'exposition. Ces méthodologies doivent pouvoir être transposées à toutes les populations concernées et mises en place par des personnels de santé non spécialisés. Ainsi, Lee et ses collaborateurs mettent en évidence un marqueur exhalé et relié à la pollution de l'air intérieur, pollution qui entraîne la mort de plus de 4 millions de personnes chaque année. La méthode de mesure proposée est réalisable par le plus grand nombre, ce qui permettrait à court terme de valider ce biomarqueur. De son côté, Jary et ses collaborateurs se sont intéressés à la pollution particulaire, dont l'impact sanitaire à court, moyen et long termes est considérable. Bien que la charge particulaire macrophagique semble constituer un marqueur biologique d'exposition aux PM2.5 pertinent et fiable, il s'avère que les méthodologies permettant actuellement de l'évaluer ne sont pas applicables en santé environnementale. La recherche d'une matrice obtenue de façon moins invasive, couplée à une approche informatique automatisée, est cette fois au cœur de l'étude. Dans les deux cas décrits ici, l'effectif étudié reste limité. Le développement d'une mesure simple et reproductible devrait ainsi d'une part permettre la proposition d'un ou de plusieurs biomarqueurs d'exposition aux polluants de l'air, mais également d'autre part de valider à grande échelle leur méthodologie de mesure.

#### **GENERAL CONCLUSION**

Biomarkers can improve research on the health effects of air pollution by allowing the exposure assessment, which increases the understanding of the underlying mechanisms and allows investigating individual susceptibility. Despite their relevance, biomarkers are still unexploited in epidemiological studies of health effects of airborne particles. Several challenges remain in the process of validating a biomarker. It must be measurable at a constant level in the body while environmental exposures are often irregular in terms of intensity and duration. The measured biological markers are frequently highly correlated to the last adverse exposures, and do not assess the chronic nature of exposure to air pollutants. The most recent analyzes of the literature agree on the low probability of the existence of a single biomarker, but the usefulness of determining a group of biomarkers to integrate both the short- and long-term exposures.

The applicability and actual use on site of the relevant biomarkers will be effective if the measurement methods are consistent with the global nature of air pollution. Both the affected population and diversity at the global level require the development of simple, fast and cheap methods of exposure characterization. methodologies should be transposed people concerned and be performed by non-specialist health workers. Thus, Lee et al. highlight an exhaled marker of indoor air pollution. The measurement method proposed is quite easy, allowing the validation of this biomarker. For its part, Jary et al. were interested in particulate matter pollution. Although airway macrophage particulate load appears to be a relevant and reliable biomarker of exposure to PM<sub>2.5</sub>, the methodologies to assess this parameter are not applicable in environmental health. The search for a less invasive matrix, coupled with an automated computer approach, is concerned. In both cases described here, the studied sample size is limited. The development of a simple and reproducible measurement should firstly enable the proposal of one or more biomarkers of exposure to air pollutants but also secondly validate their large-scale measurement methodology.

#### Lexique

Composés organiques volatils (COV): famille de molécules organiques qui se trouvent à l'état de gaz ou s'évaporent facilement dans les conditions classiques de température et de pression lors de leur utilisation (20°C et 0,01 kPa) (p.ex. benzène, acétone, formadéhyde).

Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP): composés organiques constitués par plusieurs cycles aromatiques condensés, certains atomes de carbone étant communs à deux ou trois cycles. Les HAP se forment par pyrolyse ou

combustion incomplète de matières organiques contenant du carbone et de l'hydrogène.

Lavage bronchoalvéolaire (LBA): méthode permettant d'échantillonner l'espace alvéolaire. Le LBA est réalisé pendant une bronchoscopie souple sous anesthésie. Du liquide isotonique stérile est instillé directement dans une bronche obstruée par l'extrémité du bronchoscope. Immédiatement après l'instillation, le liquide est collecté en exerçant une pression négative.

Macrophages Alvéolaires (MA): cellules phagocytaires du tractus respiratoire distal, issus des monocytes sanguins qui se différencient dans le parenchyme pulmonaire, pour arriver dans l'alvéole (50 à100 MA par alvéole). Sa durée de vie est de l'ordre du mois, voire de l'année. Après phagocytose de particules et de micro-organismes, les MA sont éliminés via le tapis mucociliaire.

Particules atmosphériques fines (Particulate Matter 2.5, PM<sub>2.5</sub>): particules de diamètre aérodynamique médian équivalent ou inférieur à 2,5 μm.

#### Publications de référence

**Rylance J, Gordon SB, Naeher LP,** *et al.* Household air pollution: a call for studies into biomarkers of exposure and predictors of respiratory disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2013; **304** (9): 571–578.

Loomis D, Grosse Y, Lauby-Secretan B, El Ghissassi F, et al. International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group IARC. The carcinogenicity of outdoor air pollution. Lancet Oncol. 2013; 14 (13): 1262-3.

Al-Sheyab N, Kheirallah KA, Mangnall LJ, Gallagher R. Agreement between exhaled breath carbon monoxide threshold levels and self-reported cigarette smoking in a sample of male adolescents in Jordan. *Int J Environ Res Public Health*. 2015; **12** (1):841-54.

**Salthammer T, Schripp T, Wientzek S, Wensing M.** Impact of operating wood-burning fireplace ovens on indoor air quality. *Chemosphere*. 2014; **103**: 205-11.

**Coburn RF, Forster RE, Kane PB.** Considerations of the physiological variables that determine the blood carboxyhemoglobin concentration in man. *J Clin Invest.* 1965; **44** (11):1899-910.

Fullerton DG, Jere K, Jambo K, Kulkarni NS, et al. Domestic smoke exposure is associated with alveolar macrophage particulate load. *Trop Med Int Health*. 2009;**14** (3): 349–54.

**Nwokoro C, Ewin C, Harrison C, Ibrahim M, et al.** Cycling to work in London and inhaled dose of black carbon. *Eur Respir J.* 2012; **40** (5): 1091–7.

#### Revues de la littérature

**Mirowsky J, Gordon T.** Noninvasive effects measurements for air pollution human studies: methods, analysis, and implications. J Expo Sci Environ Epidemiol. 2015 Jul;25(4):354-80.

**Suhaimi NF, Jalaludin J.** Biomarker as a research tool in linking exposure to air particles and respiratory health. *Biomed Res Int.* 2015: 962853.

**Demetriou CA, Vineis P.** Carcinogenicity of ambient air pollution: use of biomarkers, lessons learnt and future directions. *J Thorac Dis.* 2015 Jan;7(1):67-95.

#### Autres publications identifiées

Chen R, Qiao L, Li H, Zhao Y, et al. Fine Particulate Matter Constituents, Nitric Oxide Synthase DNA Methylation and Exhaled Nitric Oxide. *Environ Sci Technol.* 2015; **49** (19): 11859-65.

Cette étude recherche l'influence de la composition des particules fines et l'activation de deux biomarqueurs d'effet : la méthylation du gène de la Nitric Oxide Synthase et le NO exhalé. Le NO exhalé constitue un marqueur non invasif de l'inflammation des voies respiratoires. Il est produit par la Nitric Oxide Synthase dont l'expression génique serait augmentée par un mécanisme épigénétique causé par l'exposition au carbone élémentaire et organique, ainsi qu'aux ions nitrate et ammonium contenus dans les PM<sub>2.5</sub>.

Crouse DL, Peters PA, Hystad P, et al. Ambient  $PM_{2.5}$ ,  $O_3$ , and  $NO_2$  Exposures and Associations with Mortality over 16 Years of Follow-Up in the Canadian Census Health and Environment Cohort (CanCHEC). Environ Health Perspect. 2015; **123** (11):1180-6.

Dans une cohorte d'environ 2,5 millions de Canadiens, les expositions aux  $PM_{2.5}$ , à l'ozone et au  $NO_2$  ont été associées à la mortalité non accidentelle. L'exposition aux  $PM_{2.5}$  seule a, quant à elle, été corrélée à la mortalité par cancer de la trachée, des bronches et du poumon, ainsi que par maladies cardiovasculaires, coronariennes, cardiométaboliques, et diabète

**Mirowsky JE, Jin L, Thurston G, et al.** In vitro and in vivo toxicity of urban and rural particulate matter from California. *Atmos Environ*. 2015 **103**:256-262.

Des échantillons de PM<sub>2.5-10</sub> et PM<sub>2.5</sub> ont été prélevés sur 5 sites en Californie afin d'évaluer leur toxicité in vitro et in vivo. Les particules ont induit une réponse oxydante dans des cellules endothéliales pulmonaires humaines et une réponse pro-inflammatoire chez la souris. Ces réponses dépendaient de la taille et du site de prélèvement des particules. Les éléments traces terrigènes ou liés au trafic routier étaient les plus fortement liés aux effets néfastes observés.

O'Callaghan-Gordo C, Fthenou E, Pedersen M, et al. Outdoor air pollution exposures and micronuclei frequencies in lymphocytes from pregnant women and newborns in Crete, Greece (Rhea cohort). *Environ Res.* 2015; **143**:170-6.

Une association entre la pollution de l'air, notamment les PM<sub>2.5</sub>, et la fréquence des micronoyaux lymphocytaires chez les mères, mais pas chez les nouveau-nés. Cette association a été plus prononcée chez les femmes ayant un apport alimentaire inférieur en vitamine C pendant la grossesse et chez les femmes qui fument pendant la grossesse. Bien que les résultats soient significatifs chez les mères, l'association

entre l'exposition maternelle à des composés toxiques pendant la grossesse et la survenue d'effets biologiques précoces chez le nouveau-né reste mal comprise.

**Sánchez-Soberón F, Mari M, Kumar V, et al.** An approach to assess the Particulate Matter exposure for the population living around a cement plant: modelling indoor air and particle deposition in the respiratory tract. *Environ Res.* 2015; **143**:10-8.

Dans une zone influencée par une cimenterie, trois groupes de population ont été étudiés (enfants, adultes et retraités) pendant deux saisons (été et hiver). Deux modèles basés sur les concentrations ambiantes de particules (PM<sub>10</sub>, PM<sub>2.5</sub> et PM<sub>1</sub>) et l'activité individuelle ont été développés. Les doses inhalées les plus élevées pour les trois tailles de particules correspondaient aux personnes à la retraite, en raison d'une exposition plus longue à l'extérieur. Le dépôt de particules fines était plus important chez les enfants et les retraités en comparaison avec les adultes, alors qu'ils sont souvent considérés comme des groupes vulnérables de la population.

#### Liens d'intérêts :

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt

# Les microARN sont-ils des biomarqueurs placentaires prometteurs d'exposition aux polluants environnementaux ?

Période: septembre 2015 à novembre 2015

#### Perrine MARTIN | perrine.martin@univ-littoral.fr

Université du littoral Côte d'Opale - EA4492 - Unité de chimie environnementale et interactions sur le vivant (UCEIV) – Dunkerque - France

Mots clés : biomarqueurs d'exposition, microARN, placenta, polluants environnementaux

Les microARN (miARN) constituent une large famille de petits ARN simple brin non codants (20 à 24 nucléotides\*) présents dans la grande majorité des organismes vivants. Ils régulent l'expression génique de manière post-transcriptionnelle\*, soit en inhibant la traduction de l'ARN messager\* (ARNm), soit en provoquant sa dégradation. Les miARN apparaissent comme de nouveaux facteurs de régulation de l'expression génique pouvant lier polluants environnementaux et leurs maladies associées. En effet, de nombreuses études ont mis en évidence l'existence des miARN dans la circulation sanguine ainsi que dans la grande majorité des tissus et fluides biologiques; il a été montré que le spectre de ces miARN est lié à l'état physiopathologique de l'organisme, et également à l'exposition aux polluants environnementaux [1], déclenchant d'intenses efforts dans l'exploitation de leur potentiel en tant que biomarqueurs d'exposition, outils diagnostiques ou thérapeutiques.

La période intra-utérine n'échappe pas aux interactions gènes-environnement, constituant une fenêtre critique pendant laquelle des perturbations peuvent affecter à la fois le développement fœtal et la santé après la naissance. Le placenta est le principal régulateur de l'environnement intra-utérin et joue un rôle vital pour le développement et la croissance du fœtus, notamment en facilitant les échanges et l'élimination des nutriments, en fournissant une protection immunitaire, et en participant aux activités métabolique et endocrine nécessaires au fœtus. Les agents environnementaux exogènes, comme les métaux et les polluants organiques, sont capables de traverser et de s'accumuler dans le placenta [2], pouvant entraver le développement normal du fœtus [3]. Ces dix dernières années, un grand nombre d'études a mis en lumière les miARN d'origine placentaire, montrant notamment qu'ils sont continuellement libérés dans la circulation maternelle tout au long de la grossesse, suggérant ainsi la possibilité de les utiliser comme biomarqueurs des fonctions placentaires.

Devant les préoccupations croissantes concernant l'impact *in utero* des expositions aux polluants environnementaux, il apparait d'un intérêt prépondérant de déterminer si ces miARN peuvent être utilisés comme biomarqueurs de perturbations de l'environnement intra-utérin. Dans le cadre de cette revue, nous nous intéressons d'abord à l'étude de Li *et al.* (2015) qui a exploré l'association entre un panel de miARN placentaires et l'exposition à certains polluants environnementaux connus ; l'autre étude, de De Felice *et al.* (2015) cible les miARN placentaires de mères exposées au bisphénol A (BPA).

## Exploration des associations entre profil d'expression de miARN et polluants environnementaux dans des placentas humains provenant de l'Etude Nationale des Enfants

Li Q, Kappil MA, Li A, Dassanayake PS, Darrah TH, Friedman AE, Friedman M, Lambertini L, Landrigan P, Stodgell CJ, Xia Y, Nanes JA, Aagaard KM, Schadt EE, Murray JC, Clark EB, Dole N, Culhane J, Swanson J, Varner M, Moye J, Kasten C, Miller RK, Chen J. Exploring the associations between microRNA expression profiles and environmental pollutants in human placenta from the National Children's Study (NCS). Epigenetics. 2015;10(9):793-802.

#### Résumé

Des métaux comme l'arsenic (As), le mercure (Hg), le plomb (Pb), et le cadmium (Cd) ou des polluants organiques comme le dichlorodiphényldichloroéthylène (DDE), le bisphénol A (BPA), les diphényl éthers polybromés (PBDEs) et les

biphényls polychlorés (PCBs) peuvent passer la barrière placentaire suite à une exposition pendant la grossesse, s'y accumuler à des taux détectables et ont été associés à des retards de développement fœtal [4–6]. Dans cette étude, les auteurs ont évalué l'influence de ces polluants environnementaux sur l'expression de miARN dans des échantillons de placenta collectés dans la cohorte constituée lors de l'étude nationale des enfants Vanguard (National Children's Study Vanguard ou NCS). L'expression de 654 miARN dans 110 placentas obtenus à terme a été recherchée, ainsi que la présence quatre congénères du PBDE, de six congénères du PCB, des métaux As, Hg, Pb et Cd ainsi que de BPA et DDE.

Grâce à une analyse statistique approfondie, un panel de 112 miARN a été détecté dans plus de 70% des échantillons. En accord avec la littérature, les miARN exprimés dans les placentas de l'étude sont issus de gènes localisés dans une région chromosomale, appelée le chromosome 19 miRNA Cluster\* (C19MC), dont les gènes s'expriment essentiellement dans le placenta et pas ou peu dans les

autres tissus [7]. Les résultats présentés montrent bien que les niveaux des polluants organiques et des métaux sont associés à ceux de miARN spécifiques. Par exemple, le congénère du PBDE 99 est associé à une diminution du miARN let-7c alors que le PBDE 209 est associé à une augmentation du miR-188-5p. Plusieurs PCB sont associés à une augmentation du miR-1537. Concernant les métaux, les auteurs ont relevé qu'une détection de mercure était corrélée à une diminution d'un grand nombre de miARN notamment de la famille des let-7 alors qu'un niveau élevé de Pb est associé à une diminution de 4 miARN. De manière intéressante, des niveaux élevés de cadmium sont associés à une augmentation du miR-1537, comme pour les PCB, alors qu'aucune association n'a été observée entre les niveaux de DDE ou de BPA et l'expression des miARN mesurés.

Les auteurs soulignent que jusqu'à présent, peu d'études ont potentiels sur les effets des environnementaux sur l'expression de miARN chez l'humain. Le fait d'avoir mis en évidence différents profils en miARN placentaires en fonction de l'exposition aux polluants environnementaux suggère leur potentiel en tant que biomarqueurs d'exposition environnementale prénatale. De plus, certains des miARN mesurés, notamment ceux de la famille des let-7, sont connus pour jouer un rôle critique dans le développement embryonnaire précoce, essentiellement dans la différenciation. Des études approfondies sur les interactions entre miARN placentaires et leurs cibles ARNm seraient pertinentes pour évaluer le rôle d'une régulation épigénétique placentaire dans le développement embryonnaire.

#### Commentaire

Cette étude est intéressante car il s'agit de la première portant sur l'expression de miARN placentaires, et reliée à l'exposition à ces polluants organiques et ces métaux, et mesurée dans des cellules issues de prélèvements humains. Un large panel de miARN a été mis en évidence et les auteurs ont détecté l'expression de 112 miARN sur les 654 utilisés dans le test. Ceci est relativement peu, dû en partie au fait que dans le placenta, l'expression génique est restreinte, mais également, parce que l'analyse statistique réalisée ne concernait que les miARN dont l'expression est significativement induite.

La population étudiée est relativement homogène car les auteurs ont restreint les critères concernant le mode d'accouchement (uniquement par voie basse), la durée de la grossesse (37 à 42 semaines) ainsi que l'absence d'anomalies pathologiques. Ils ont également fait en sorte de récupérer les ARN placentaires au maximum 6h après la délivrance. assurant ainsi une bonne stabilité de ces molécules, et ils ont quantifié les polluants dans les mêmes échantillons, et non dans l'urine, ce qui permet de conclure à une relation directe entre exposition et expression des miARN. Ces critères mettent en lumière la complexité d'obtenir ces prélèvements puisqu'ils dépendent de la date de l'accouchement. D'autre part, il est difficile de savoir réellement à quelles quantités de polluants le fœtus a été exposé tout au long de la grossesse et quels sont les miARN produits en réponse aux différents stades du développement.

Il serait peut-être pertinent de réaliser les mêmes mesures (polluants et miARN identifiés) mais cette fois dans des échantillons plus facilement accessibles tels que le sang ou l'urine maternels, à différents stades du développement, pour réellement qualifier les miARN identifiés de « biomarqueurs d'exposition ». Néanmoins les résultats obtenus dans cette étude sont prometteurs et pourraient également ouvrir un nouveau volet mécanistique sur l'effet des polluants environnementaux et leurs conséquences épigénétiques sur le développement fœtal.

## Profil d'expression pangénomique de miARN dans des placentas de femmes enceintes exposées au BPA.

De Felice B, Manfellotto F, Palumbo A, Troisi J, Zullo F, Di Carlo C, Di Spiezio Sardo A, De Stefano N, Ferbo U, Guida M, Guida M. Genome-wide microRNA expression profiling in placentas from pregnant women exposed to BPA. *BMC Med Genomics*. 2015;**7**;8:56.

#### Résumé

Le bisphénol A (BPA) est un polluant environnemental connu pour son potentiel de perturbateur endocrinien. Une exposition au BPA peut être associée à des conséquences néfastes sur la santé du fœtus, de l'enfant et même de l'adulte, comme des effets délétères sur la reproduction et le développement, l'apparition de maladies métaboliques et même de cancers [8]. Plusieurs études montrent qu'il peut s'accumuler dans les tissus ou les fluides biologiques tels que les fluides amniotiques et folliculaires, le sang de cordon ombilical, le lait maternel et le placenta. De par son potentiel toxique et oestrogénique, le BPA peut entraîner des effets irréversibles sur le développement de l'appareil reproducteur (hypospadias\* par exemple) ou encore sur le poids de naissance.

Une exposition au BPA peut également entrainer des modifications épigénétiques [9], mais jusqu'à présent, seule une étude, réalisée *in vitro*, a montré qu'une telle exposition sur des cellules humaines placentaires pouvait altérer le niveau d'expression en miARN, notamment du miR-146a [10].

Ici, De Felice et al. ont réalisé pour la première fois une étude pangénomique, c'est-à-dire portant sur un large panel de miARN à l'aide d'une puce, d'une part sur 40 échantillons de placenta provenant de femmes enceintes vivant sur une zone polluée et dont le fœtus montrait des malformations (groupe de patientes), et d'autre part sur 40 échantillons de placentas de femmes vivant dans une zone non polluée et ayant eu une grossesse normale (groupe contrôle), toutes ayant subi un avortement thérapeutique au deuxième trimestre de grossesse. Sur 1349 miARN testés, 34 d'entre eux ont montré une différence d'expression significative d'au moins 2,5 fois, dont miR-146a, fortement induit dans les échantillons de placentas de fœtus malformés. Cette induction importante de miR-146a est en corrélation avec la quantité de BPA dosée dans ces mêmes échantillons. Les auteurs ont continué l'étude en analysant les gènes cibles de miR-146a grâce à une banque de données afin de mettre en lumière la signification fonctionnelle de ces résultats. Ils ont pu mettre en évidence 19 fonctions biologiques associées aux gènes cibles de miR-146a et que les auteurs estiment influencées par une exposition au BPA. Parmi elles, certaines concernent des gènes impliqués dans le développement de maladies neuronales ou cardiovasculaires, dans les voies d'initiation de cancers ou encore dans la régulation du système endocrine, fonctions connues pour être influencées par une exposition au BPA.

En conclusion, les auteurs précisent qu'il s'agit d'une étude préliminaire à d'autres études plus approfondies, mais soulignent l'utilité d'étudier les profils d'expression en miARN pour améliorer notre compréhension de l'action des toxiques environnementaux sur le développement fœtal.

#### Commentaire

Comme dans l'étude précédente, les auteurs montrent une détection corrélation entre la d'un polluant environnemental, ici le BPA, et la modification de l'expression de miARN, notamment miR-146a, directement dans des cellules de placentas issues de femmes enceintes. On peut donc penser qu'il y a un lien direct de cause à effet, d'autant que les auteurs mentionnent le fait d'avoir mesuré dans des placentas de fœtus malformés provenant de femmes vivant dans une zone non polluée, des quantités de miR-146a similaires à ceux mesurés chez des femmes ayant une grossesse saine (quantités faibles); et d'autre part des quantités de mi-ARN-146a similaires dans des placentas de femmes vivant dans une zone polluée mais ayant eu un fœtus normal, à celles vivant dans une zone polluée et ayant eu un fœtus malformé (quantités élevées). Il aurait été intéressant d'avoir ces résultats exploités dans l'article, et également de définir ce que les auteurs appellent « zone polluée », notamment en mesurant les quantités de BPA auxquelles ces femmes ont réellement été exposées durant leur grossesse dans les zones en question.

Les auteurs mentionnent bien que tous les échantillons proviennent de placentas collectés durant le deuxième semestre de grossesse, mais ne précisent pas les raisons de l'avortement dans les cas de grossesses saines. Ce groupe servant de contrôle, il aurait été pertinent de l'indiquer afin de s'assurer de l'absence de biais.

Concernant l'analyse pangénomique, 1349 miARN ont été quantifiés, mais les auteurs n'ont relevé que 34 significativement modulés. Ils mentionnent avoir confirmé ces changements d'expression par RT-qPCR, et il aurait été intéressant que ces résultats soient présentés dans l'article. Les auteurs se sont en effet limités à un seul miARN, le miR-146a, ce qui est dommage après avoir réalisé une expérience de si grande ampleur. Néanmoins, ce résultat confirme celui obtenu lors d'une précédente étude réalisée in vitro [9].

Enfin, les auteurs ont essayé d'identifier les voies de régulation dans lesquelles miR-146a est potentiellement impliqué. Comme souvent dans ce type d'analyse, plusieurs voies apparaissent et se croisent, notamment celles ayant déjà été montrées comme modulées par le BPA, mais ceci n'est pas suffisant pour conclure. Il aurait été adéquat de s'attarder expérimentalement sur l'une de ces voies.

Toutefois, cette étude est préliminaire et confirme l'intérêt des miARN en tant que biomarqueurs placentaires prometteurs à la fois d'exposition et d'effet.

#### CONCLUSION GÉNÉRALE

La compréhension des effets des expositions in utero aux polluants environnementaux est d'une grande importance puisque la dérégulation des processus biologiques qui en résulte peut à la fois affecter le développement fœtal et avoir des conséquences néfastes sur la santé qui se manifesteront plus tard au cours de la vie. En raison de leur rôle établi dans les processus de développement, les miARN ont émergé en tant que candidats intéressants dans l'exploration des impacts de telles expositions pendant cette fenêtre critique de susceptibilité qu'est la grossesse. L'analyse des changements d'expression en miARN associés aux expositions environnementales et à la croissance fœtale peut fournir des éléments critiques sur la biologie du développement, la réponse in utero aux expositions et l'évaluation du risque d'impact sur la santé pendant la période prénatale. Jusqu'à présent, les études traitant du sujet portaient uniquement sur l'animal ou des lignées cellulaires [11].

Les deux publications présentées ici constituent des études préliminaires à l'identification de miARN placentaires produits en réponse à une exposition à des polluants environnementaux, et pour la première fois sur des échantillons humains. Dans les deux cas, les auteurs mettent bien en évidence une modification de l'expression de miARN provenant directement d'échantillons placentaires de femmes ayant été exposées à des produits toxiques, tels que des métaux ou des polluants organiques. L'étude de de Felice et al. va plus loin en tentant d'en déduire les voies de signalisation impliquées par une modification d'expression d'un de ces miARN.

Mais ces deux études posent également la question de l'obtention des échantillons utilisés pour l'évaluation des modifications d'expression des miARN placentaires et ceci à deux niveaux : (i) les échantillons sont difficiles à obtenir puisqu'ils nécessitent que la grossesse soit terminée, (accouchement ou avortement), et (ii) ne sont donc accessibles qu'une fois que l'exposition placentaire est terminée pour le fœtus, ce qui rend l'estimation de l'exposition effective tout au long de la grossesse impossible. Le sang maternel pourrait offrir un moyen de surveiller les changements dynamiques des niveaux d'expression durant la grossesse, permettant un focus sur des périodes spécifiques de la gestation. Cependant, la faible proportion de miARN placentaires dans la circulation maternelle empêcherait probablement d'avoir une vision exhaustive du profil d'expression spécifiquement placentaire.

L'accumulation rapide des preuves reliant miARN et polluants environnementaux, couplée avec le rôle unique des miARN comme régulateurs de l'expression génique, en font des biomarqueurs prometteurs à la fois pour élucider les mécanismes et développer des stratégies de prévention plus efficaces des maladies environnementales. Pour aboutir à leur utilisation en tant que tels durant la grossesse, il est nécessaire de réaliser des études sur les miARN provenant de grandes populations en relation avec des expositions environnementales, et ce sur des échantillons facilement accessibles tout au long de la grossesse.

#### **GENERAL CONCLUSION**

Understanding the effects of in-utero exposures to environmental agents is of great importance since the resulting deregulation of biological processes can affect both fetal development and health outcomes that appear later in life. Due to their established role in developmental processes, miRNAs have emerged as attractive candidates to explore the impact of the exposures during this critical window of susceptibility that is pregnancy. Examination of miRNA expression changes associated to environmental exposures and fetal growth can provide critical elements on development biology, in-utero response to exposures and risk assessment of health impact during prenatal period. Until now most studies focuse on animal models or cell lines [11].

Present publications constitute preliminary studies of placental miRNA identification in response to environmental pollutants exposure, for the first time on human samples. In both cases, the authors clearly highlight miRNA expression modification from samples obtained from placentas of women exposed to toxicants, as metals or organic pollutants. De Felice et al. study goes further by tempting to identify signalization pathways caused by expression modification of one of these miRNA.

Both studies raise the question of obtaining samples enabling placental miRNA expression modification at two levels: (i) the difficulty to get them since it implies the term of the pregnancy (delivery or abortion), and (ii) the exposure estimation of the fetus remains impossible. Maternal blood could offer a way to monitor dynamic changes in expression level throughout pregnancy, enabling the focus on specific gestational periods. However, the weak proportion of placental miRNA in maternal circulation would likely fail to account for the comprehensive expression profile of the placenta.

The rapidly growing evidence linking miRNAs expression and environmental pollutants, meaning the unique regulatory role of miRNAs in gene expression, makes them promise biomarkers for elucidating the mechanisms and developing more effective prevention strategies for environmental diseases. To result in such use during pregnancy, large population studies of miRNAs in relation to environmental exposure are warranted, on easily accessible samples along pregnancy.

#### Lexique

ARN messager (ARNm): Acide RiboNucléique, molécule intermédiaire entre l'information génétique portée par l'ADN (le gène), et les protéines synthétisées dans le cytoplasme de la cellule

**Cluster**: Groupe de deux ou plusieurs gènes codant pour des peptides, protéines ou miARN similaires, qui partagent une même fonction et souvent localisés dans une même région du génome limitée à quelques milliers de paires de bases.

**Cohorte :** Ensemble d'individus ayant vécu un même événement au cours d'une même période.

**Hypospadias :** Malformation du fœtus masculin, qui se manifeste par l'ouverture de l'urètre dans la face inférieure du pénis au lieu de son extrémité.

**Nucléotide**: Monomère de base de l'acide désoxyribonucléique (ADN)ou l'acide ribonucléique (ARN), composé d'un groupement phosphate (ou acide phosphorique), d'un pentose (sucre à cinq atomes de carbone, le désoxyribose pour l'ADN et le ribose pour l'ARN) et d'une base azotée (purine A, G ou pyrimidine C, T).

Pangénomique: Une étude pangénomique consiste à réaliser une sorte de carte d'identité génétique d'un individu en analysant l'ensemble de son génome.

**Perturbateur endocrinien :** Substance chimique d'origine naturelle ou artificielle étrangère à l'organisme qui peut interférer avec le fonctionnement du système endocrinien (hormonal) et induire ainsi des effets délétères sur cet organisme ou sur ses descendants.

**Post-transcriptionnel :** Qui concerne l'ensemble des modifications qu'un ARN subit après avoir été transcrit.

RT-qPCR: Real-Time quantitative Polymerase Chain Reaction.

#### Publications de référence

- 1 **Hou L, Wang D, Baccarelli A.** Environmental chemicals and microRNAs. *Mutat Res Mol Mech Mutagen* 2011;714:105–12.
- 2 **Leino O, Kiviranta H, Karjalainen AK, et al.** Pollutant concentrations in placenta. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc* 2013;54:59–69.
- 3 Aylward LL, Hays SM, Kirman CR, et al. Relationships of Chemical Concentrations in Maternal and Cord Blood: A Review of Available Data. J Toxicol Environ Health Part B 2014;17:175–203.
- 4 Caserta D, Graziano A, Lo Monte G, *et al.* Heavy metals and placental fetal-maternal barrier: a mini-review on the major concerns. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2013;**17**:2198–206.
- 5 **Gascon M, Morales E, Sunyer J**, *et al.* Effects of persistent organic pollutants on the developing respiratory and immune systems: a systematic review. *Environ Int* 2013;**52**:51–65.

- 6 **Quinete N, Schettgen T, Bertram J**, *et al.* Occurrence and distribution of PCB metabolites in blood and their potential health effects in humans: a review. *Environ Sci Pollut Res Int* 2014;**21**:11951–72.
- 7 Hromadnikova I, Kotlabova K, Ondrackova M, et al. Expression profile of C19MC microRNAs in placental tissue in pregnancy-related complications. *DNA Cell Biol* 2015;34:437–57.
- 8 Rochester JR. Bisphenol A and human health: a review of the literature. Reprod Toxicol Elmsford N 2013;42:132–55.
- 9 **Singh S, Li SS-L.** Epigenetic effects of environmental chemicals bisphenol A and phthalates. *Int J Mol Sci* 2012;13:10143–53.
- 10 Avissar-Whiting M, Veiga KR, Uhl KM, et al. Bisphenol A exposure leads to specific microRNA alterations in placental cells. Reprod Toxicol Elmsford N 2010;29:401–6.
- 11 **Kappil M, Chen J.** Environmental exposures in utero and microRNA. *Curr Opin Pediatr* 2014;26:243–51.

#### Revues de la littérature

**Mouillet J-F, Ouyang Y, Coyne CB, et al.** MicroRNAs in placental health and disease. *Am J Obstet Gynecol* 2015;**213**:S163–72.

**Vrijens K, Bollati V, Nawrot TS.** MicroRNAs as Potential Signatures of Environmental Exposure or Effect: A Systematic Review. *Environ Health Perspect* 2015;**123**:399–411.

**Marsit CJ.** Influence of environmental exposure on human epigenetic regulation. *J Exp Biol* 2015;**218**:71–9.

#### Autres publications identifiées

Sanders AP, Burris HH, Just AC, *et al.* Altered miRNA expression in the cervix during pregnancy associated with lead and mercury exposure. *Epigenomics* 2015.

Les métaux lourds comme le plomb et le mercure sont associés à des effets délétères sur le développement fœtal. Le but de cette étude était d'évaluer l'association entre l'expression en miARN identifiés au niveau du col de l'utérus pendant la grossesse d'une part, et les niveaux de plomb dans le sang et les os ainsi que de mercure dans les ongles de pied d'autre part. 17 miARN ont été associés négativement à des niveaux élevés de mercure et deux autres à des niveaux élevés de plomb. Cette étude est intéressante car elle utilise des échantillons facilement accessibles pendant la grossesse, comme des cellules du col de l'utérus, des ongles de pied et du sang. Evaluer le degré d'exposition du fœtus par ce type d'échantillonnage reste compliqué car les cellules obtenues ne sont pas en contact direct avec le fœtus. Néanmoins, l'augmentation du nombre d'échantillons de ce type et l'établissement d'une corrélation entre des quantités de métaux, un profil de miARN et des effets délétères sur le fœtus ou le nouveau-né, comme des avortements spontanés, des naissances avant terme ou des malformations, permettrait de valider ce type d'échantillonnage et l'utilisation des miARN comme biomarqueurs d'exposition.

**LaRocca J, Binder AM, McElrath TF, et al.** First-Trimester Urine Concentrations of Phthalate Metabolites and Phenols and Placenta miRNA Expression in a Cohort of U.S. Women. *Environ Health Perspect* 2015.

Les phtalates et les phénols font partie des perturbateurs endocriniens et sont retrouvés dans beaucoup de produits de la vie courante comme dans les plastiques, les résines époxy et les cosmétiques. Le but de cette étude était de déterminer si une exposition à ces composés pendant le premier trimestre de grossesse pouvait perturber l'expression de miARN dans le placenta. Parmi 86 miARN testés, deux sont associés à une augmentation du phénol dans les urines, alors qu'un seul miARN est associé à une augmentation des phtalates. Les auteurs ont réalisé une prédiction des ARNm cibles des 3 miARN identifiés et ont mis en évidence 19 voies biologiques potentiellement affectées. Dans tous les cas, les auteurs n'ont observé aucune corrélation avec des effets néfastes sur les nouveau-nés. Il s'agit de la première étude portant sur l'association entre l'expression de miARN placentaires et la détection de phtalates et de phénols dans les urines. Comme pour l'étude précédente, la présence de ces composés dans les urines n'est pas forcément représentative d'une exposition du fœtus à ces polluants, d'autant que les auteurs n'ont relevé aucun effet néfaste sur les nouveau-nés. De plus, contrairement aux études de Li et al. et de De Felice et al., les composés toxiques ont été mesurés dans les urines, et non dans les placentas, rendant leur association avec l'expression de miARN placentaires plus difficile. Néanmoins, cette étude est intéressante justement par le fait qu'elle utilise des échantillons d'urine, plus facilement accessibles tout au long de la grossesse.

#### Liens d'intérêts :

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt



## ulletin Connaître, évaluer, protéger

-cientifique

Édition scientifique • Bulletin de veille n° 29 • Septembre 2016 Notes d'actualité scientifique

Risques sanitaires et société

# Exposition à la pollution de l'air : de l'exposition différenciée à la question de mortalité

Période : septembre 2015 à novembre 2015

#### Gilles MAIGNANT

CNRS - UMR 912 SESSTIM - Nice - France

Mots clés : exposition, mortalité, périnatalité, pollution de l'air, trafic

Les trois articles discutés ci-après permettent de mieux appréhender les relations santé — environnement, en termes d'exposition en se focalisant sur différents stades de vie ou lieux de vie : exposition périnatale et atopie à l'âge d'un an pour l'article de Sbihi et al, l'impact du choix du mode de déplacement (vélo versus voiture) sur l'exposition cumulée à la pollution de l'air (article de Good et al.). Enfin, l'article de Atkinson et al. fait le lien entre exposition à court terme à la pollution de l'air et mortalité journalière. Bien que ces trois articles traitent de zones différentes (grandes villes canadiennes, Etats-Unis, Londres), ils questionnent, tous les trois, la relation complexe santé — environnement à travers le prisme de l'exposition à la pollution de l'air.

Exposition périnatale à la pollution de l'air issue du trafic routier et atopie à l'âge d'un an, étude sur une cohorte canadienne de naissances.

**Sbihi H** *et al.* Perinatal Exposure to Traffic-Related Air Pollution and Atopy at 1 year of Age in a Multi-Center Canadian Birth Cohort Study. *Environmental Health Perspectives* 2015 Vol. **123** number 9

#### Résumé

Le nombre d'allergies en ville n'a cessé d'augmenter ces dernières décennies, mais le rôle de la pollution routière reste encore à préciser. En partant d'une cohorte (CHILD\*) de 3600 familles canadiennes, les auteurs ont couplé les données d'exposition intégrant la pollution issue du trafic routier avec les allergies rencontrées. Des tests ont été réalisés sur les enfants pour connaître leurs sensibilités aux allergènes (6 substances inhalés et 4 alimentaires). Des modèles LUR\* ont été développés pour estimer les concentrations de NO2 aux lieux de résidence du panel, même si ceux-ci ont tendance à surestimer ou sous-estimer les doses réelles respirées. Ces modèles sont fondés sur des données d'utilisation du sol, trafic routier, population, environnement physique et météorologie. L'exposition au NO2 a été faite selon deux scenarios (adresse à la date de la naissance, ou reconstitution de l'exposition à partir de l'exposition estimée à chaque adresse renseignée). Des questionnaires sur le mode de vie complètent cette étude et permettent d'ajuster les résultats au regard des facteurs de confusion tels que la fumée de cigarette, la présence ou pas d'animaux, ou encore des facteurs génétiques (sexe, asthme ou allergies des parents).

#### Commentaire

Les résultats montrent que les taux de sensibilisation allergique varient peu suivant les méthodes d'évaluation de l'exposition, 16% en utilisant une estimation conduite avec le

modèle LUR et 13.5% avec des données recueillies pour les personnes situées à l'extérieur de la zone couverte et intégrées au modèle LUR. De plus, particulièrement dans la première année de vie, les enfants sont beaucoup plus sensibles à des allergies de type alimentaires qu'environnementales. Cependant, dans cette cohorte prospective, l'exposition au NO2 au cours de la première année de vie, mais pas pendant la grossesse, a été positivement associé à l'atopie à l'âge de 1 an. Ce qui montre clairement le rôle de la pollution de l'air. Les auteurs ont d'ailleurs exploré la possibilité d'autres facteurs que le simple trafic routier, ce qui constitue un véritable point fort de cette étude. Par exemple, ils n'ont pas trouvé de différences significatives selon le sexe de l'enfant. De plus, comme les tests d'allergie ont été réalisés sur la peau (mesure objective), la méthodologie employée est complètement reproductible. L'une des limites de cette étude provient de la méthode par questionnaire autoadministré, sur les facteurs environnementaux du domicile, qui est probablement biaisé par le statut socio-économique des personnes (répondants aux enquêtes). Une autre limite provient du modèle d'estimation de la pollution de l'air, transposé des Etats Unis au Canada (paramètre d'infiltration dans les habitats) qui ne tient pas compte de la variabilité spatiale et temporelle. Cependant des liens forts entre trafic routier et atopie ont été trouvés lorsque l'on considère les (garderie, parcours des enfants temps-activités individuelles).

Etude sur la banlieue de Fort Collins : Evaluation de l'impact du type de route et du mode de transport sur l'exposition personnelle à divers polluants.

**Good N,** et al. The Fort Collins Commuter Study: Impact of route type and transport mode on personal exposure to multiple

air polluants. Journal of Exposure Science and Environmental 2015, 1-8

#### Résumé

La pollution de l'air liée au trafic routier est responsable d'une augmentation de mortalité et de morbidité. Cependant peu d'études s'intéressent à la question de l'exposition individuelle pendant le trajet (impact du choix de route ou du mode de transport : bicyclette versus automobile). L'objectif de cette étude (381 jours de données), basée sur la cohorte Fort Collins (45 personnes), est d'estimer l'environnement subi au cours de son déplacement et de voir si des solutions alternatives sont intéressantes, notamment en termes de trajet-tempsexposition. L'étude s'appuie sur un panel de personnes qui ont un trajet domicile-travail d'au-moins 2.4 km, âgées de 18 à 65 ans, titulaires d'un permis de conduire, non-fumeurs et non exposées régulièrement aux poussières et vapeurs professionnelles. Chaque participant devait identifier un trajet direct et des alternatives possibles et répondre à un questionnaire sur leur pratique journalière (chauffage, climatisation, type de véhicule etc.). Les trajets du matin et du soir étaient évalués séparément, pour tenir compte de l'environnement différencié, avec une analyse séparée des résultats. De plus des mesures portatives de pollution et d'effort physique étaient effectuées tout au long du trajet, mesures géo-référencées par GPS. La moyenne pondérée dans le temps et l'exposition cumulée à chaque polluant sont ainsi calculées pour chaque trajet.

#### Commentaire

L'un des apports majeurs de cet article est de démontrer que si l'on considère les expositions cumulées, la différence d'exposition (vélo versus voiture) reste faible. Lors des trajets matinaux, les cyclistes semblent toutefois être davantage exposés à la pollution particulaire (BC3: +92%,  $PM_{2.5}^{4}$ : +96%,  $PNC^{5}$ : +123%) que les conducteurs automobiles, mais moins exposés au CO<sup>6</sup> (-8%) (95% IC<sup>7</sup>). Les écarts d'exposition sont plus faibles en fin de journée. Il faudrait compléter cette étude avec d'autres polluants. Le dilemme vient du fait que les cyclistes peuvent avoir des trajets rallongés, unitairement moins pollués, mais dont l'exposition cumulée est plus grande que celle du trajet direct en voiture (optimum relatif). En effet, les doses inhalées dépendent aussi de l'activité respiratoire (plus grande ventilation en pédalant), du temps passé sur chaque axe et de l'exposition individuelle (donc du type de route et du mode utilisé). De même, rouler vitres ouvertes ou fermées n'influence pas trop les résultats, mais ceci mériterait d'être approfondi par la prise en compte d'autres facteurs (air intérieur, vitres partiellement ouvertes, saisonnalités etc.). Une autre limite de cette étude réside dans le choix des routes alternatives qui, pour être sélectionnées, ne doivent pas rallonger substantiellement le trajet, ce qui oblige à ne pas considérer toutes les routes alternatives possibles, de même que la taille du panel. Cependant ce qui reste novateur dans cette étude est le fait de prendre en compte quatre alternatives : trajet direct en voiture, trajet alternatif en voiture, trajet direct en vélo, trajet alternatif en vélo. Mais, pour améliorer la protection

des cyclistes, il serait également judicieux d'envisager des pistes loin des axes de fortes circulations routières et de s'intéresser également aux autres polluants. Enfin, les auteurs mentionnent d'autres études présentant des résultats contrastés avec pour certaines une exposition moindre en vélo qu'en voiture sur des trajets similaires, particulièrement pour les polluants gazeux.

## Exposition à court terme à la pollution de l'air liée au trafic et mortalité quotidienne à Londres, Royaume-Uni.

**Atkinson R.W.** Short-term exposure to traffic-related air pollution and daily mortality in London, UK. Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology 2015, 1-8

#### Résumé

De très nombreuses études épidémiologiques s'intéressent aux liens entre concentrations journalières moyennes de polluants, toutes sources confondues, et mortalité mais peu s'intéressent au rôle particulier de la pollution routière, ce qui permettrait de mieux guider les politiques de réduction. L'étude est basée sur des concentrations mesurées à Londres entre 2011 et 2012. Les polluants choisis selon la littérature sont les NO<sub>x</sub>\* (traceur de la pollution globale), le carbone élémentaire dans la fraction  $\mathrm{PM}_{10}^{\phantom{10}*}$  et le black carbon dans la fraction PM<sub>2.5</sub>\* (issues des diesels), le CO\* (des essences), le cuivre (pneus), le zinc (freins) et l'aluminium (poussières minérales). Concernant le volet santé, le registre des décès pour la période du 01 juin 2011 au 31 décembre 2012 est utilisé. Il répertorie le nombre de décès journaliers à Londres, toutes maladies confondues ainsi que le nombre de décès pour maladies cardiovasculaires et respiratoires. Les concentrations de polluants, quant à elles, proviennent de différents réseaux de mesures de la qualité de l'air londonien, ainsi que des modélisations de la qualité de l'air (plus de 100 points de comptages en tout). Un modèle de régression de Poisson, tenant compte de la saisonnalité et de la météorologie, est utilisé pour estimer la variation en pourcentage du risque de décès associé à l'incrémentation d'un interquartile de chaque polluant.

#### Commentaire

Dans cette étude qui a duré deux ans, les données de mortalité étaient disponibles durant 722 jours, celles de pollution durant 628 jours permettant d'obtenir des résultats significatifs sur les liens mortalité – pollution à l'échelle de la ville de Londres. Les données de décès sont renseignées par les médecins qui attribuent la cause probable à chacun des décès. Ainsi, sur les 117 décès journaliers (nombre médian), 35 peuvent être attribués à des causes cardiovasculaires et 17 à des problèmes respiratoires. En couplant ces données médicales et les données de pollution à travers un modèle statistique (modèle additif), les auteurs ont montré une corrélation positive entre les concentrations quotidiennes à deux jours en EC\* et BC\* et les données de mortalité respiratoire. Les résultats ont également permis de démontrer un impact saisonnier faible sur ces résultats (légère augmentation lors des mois chauds). Pour affiner ces résultats, il serait pertinent d'approfondir les sources de pollution (complexité et nombre de sources) pour mieux caractériser les liens avec la santé. Bien qu'intéressante cette étude reste limitée car elle ne permet pas de prendre en compte des données de pollution à échelle fine et la santé différenciée des personnes (on ne connait pas le lieu de vie, ni l'historique de santé des personnes décédées), ce qui amenuise la possibilité de formuler des recommandations précises aux décideurs publics; elle possède néanmoins l'avantage de caractériser certains polluants comme traceurs de certaines pathologies. Cependant, elle a permis de mettre en avant l'impact du diesel sur la mortalité respiratoire plutôt que d'autres sources comme l'essence, les freins ou encore les pneus.

#### **C**ONCLUSION GÉNÉRALE

La connaissance des liens environnement - santé doit encore être approfondie et ce particulièrement à une échelle fine, notamment en essayant de distinguer au mieux le rôle des cofacteurs. Bien que reposant sur des cohortes de patients, ces études pourraient être encore améliorées notamment par la densification de campagnes de mesures et l'utilisation d'outils de modélisation de la pollution de l'air à haute résolution (lieux de vie successifs). La prise en compte complexe des itinéraires des personnes constituant ces cohortes (itinéraires médicaux, itinéraires de vie et de lieux de vie...) reste difficile à mettre en place. Les trois articles ont proposé une avancée significative dans la compréhension de l'exposition à la pollution de l'air (exposition périnatale et allergies, exposition lors de son déplacement et lien avec la mortalité quotidienne).

#### GENERAL CONCLUSION

Knowledge of environmental - health links still needs to be investigated and particularly on a fine scale, especially by trying to better distinguish the role of cofactors. Although based on cohorts of patients, these studies could be further improved through increasing the campaigns' measurement and the use of air pollution modelling tools with a high spatial resolution (successive living places). Taking into account the complex lifestyle of the persons constituting these cohorts (medical path, life itineraries and places of living ...) will be better but difficult to implement. The three articles proposed a significant advance in the understanding of air pollution's exposure (perinatal exposure and atopies, exposure during his path and link with daily mortality).

#### Lexique

BC: Black carbone: suies

BC en PM<sub>2.5</sub> : Black carbon (Carbone noir) dans les particules fines de tailles inférieures à 2.5  $\mu m$ 

CHILD Canadian Healthy Infant Longitudinal Development : Cohorte de suivi médical d'enfants entre 0 et 5 ans.

CO: Monoxyde de carbone

EC en  $PM_{10}$ : Elementary carbon (Carbone élémentaire) dans les particules fines de tailles inférieures à 10  $\mu m$ 

IC : Intervalle de confiance [moyenne – écart type ; moyenne + écart type]

**LUR** : Land Use Regression Model : modèle de régression de l'occupation du sol.

NO<sub>x</sub>: Oxydes d'azote

PM<sub>2.5</sub>: Particules fines de tailles inférieures à 2.5 μm

PNC: Concentration particulaire (en nombre)

#### Publications de référence

- 1 Rohr A, Wyzga R. Attributing health effects to individual particulate matter constituents. *Atmospheric Environment* 2012; **62**: 130-152.
- 2 **Dominici F, Peng RD, Bell ML,** *et al.* Fine particulate air pollution and hospital admission for cardiovascular and respiratory diseases. *JAMA* 2006; **295** (10): 1127-1134.
- 3 **Burnett R, Brook J, Dann T,** *et al.* Association between particulate and gas-phase components of urban air pollution and daily mortality in eight Canadian cities. *Inhal Toxicol* 2000; **12**: 15-39.
- 4 Laden F, Neas L, Dockery D, Schwartz J. Association of fine particulate matter from different sources with daily mortality in six US cities. *Environ Health Perspect*. 2000; **108(10)**: 941-947. doi: 10.1289/ehp.00108941.
- 5 Pope C, Burnett R, Thun M, et al. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *Jama-Journal of the American Medical Association*. 2002; **287(9)**: 1132-1141. doi: 10.1001/jama.287.9.1132.

#### Revues de la littérature

- 1 Deffner V, Küchenhoff H, Maier V, Pitz M, Cyrys J, Breitner S, Schnieder A, Gu J, Gerusschkat U, Pters A. Personal exposure to ultrafine particles: Two-level statistical modeling of background exposure and time-activity patterns during three seasons. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology* 2014; doi:10.1038/jes.2014.73.
- 2 Bennett O, Kandala NB, Ji C, Linnane J, Clarke A. Spatial variation in heart failure and air pollution in Warwickshire, UK: an investigation of small scale variation at the ward level. *The Lancet, Vol. 384, 19 november 2014,* DOI: 10.1015/S0140-6736(14)62146-2

3 Gordon SB, Bruce NG, Grigg J, Hibberd PL, Kurmi OP, Lam KBH, Mortimer K, Asante KP, Balakrishnan K, Balmes J, Bar-Zeev N, Bates MN, Breysse PN, Buist S, Chen Z, Havens D, Jack D, Jindal S, Kan H, Mehta S, Moschovis P, Naeher L, Patel A, Perez-Padilla R, Pope D, Rylance J, Semple S, Martin WJ. Respiratory risks from household air pollution in low and middle income countries. The Lancet Respiratory Medecine, Vol. 2, Issue 10, Pages 823-860, October 2014, DOI: 10.1016/S2213-2600(14)70168-7

#### Autres publications identifiées

Jiaojiao L, Leichao L, Yi F, Rena L, Yu L. Air Pollution exposure and Physical Activity in China: Current Knowledge, Public Health Implications and Future Research Needs. International J. Environ. Res. Public Health, 2015, 12:14887-14897

Cet article aurait pu être sélectionné car il apporte également des connaissances sur les effets à long terme de l'exposition à la pollution de l'air notamment en termes de maladies et/ou de mortalité. De par le couplage pollution de l'air et activité physique en extérieur il est très proche de l'article s'intéressant aux trajets alternatifs (vélo versus automobiles). Les auteurs s'intéressent également à l'impact de la mise en place de politiques de régulation de la pollution sur l'amélioration de la santé dans différentes grandes villes chinoises.

Challoner A, Pilla F, Gill L. Prediction of Indoor Air Exposure from Outdoor Air Quality Using an Artificial Neural Network Model for Inner City Commercial Buildings. *International Journal of Environmental Resarch and Public Health*, 2015, 12: 15233-15253

Cet article s'intéresse précisément aux échanges de pollution de l'air qui existent entre l'air intérieur et l'air extérieur en se basant sur des immeubles à usages commerciaux, en Irlande. Cette étude se focalise donc sur la pollution de l'air intérieur, qui correspond à 90% du temps passé. Elle permet de coupler des modèles d'allocation d'activité s'appuyant sur des systèmes d'information géographique pour prédire la qualité de l'air extérieure au bâtiment et des réseaux de « neurones artificiels » pour modéliser les échanges air intérieur — air extérieur du bâtiment considéré. Les résultats ont cependant montré des erreurs de prédiction non négligeables pour l'air intérieur.

Wu J, Xie W, Li W, Li J. Effects or Urban Landscape Pattern on PM2.5 Pollution – A Beijing Case Sudy. *Plos One, 2015, 10(11)* 

L'objectif de cet article est d'estimer le rôle de certains éléments du paysage urbain (eau, végétation, bâti...) sur les concentrations de particules PM<sub>2.5</sub>, dans la ville de Beijing (ville la plus polluée de Chine), en se basant sur des modèles statistiques de régression multiple couplés à des systèmes d'information géographique. Les données de la qualité de l'air, mobilisées ici, comprennent aussi bien des stations dites de trafic que des stations de fond urbaines et régionales. Cet article est également intéressant par l'analyse saisonnière des concentrations de PM<sub>2.5</sub>, en fonction des différents types de sites ; mais il n'est pas très novateur.

#### Liens d'intérêts :

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt

## Droit, sciences et expertise, regards croisés

Période: août 2015 à novembre 2015

Marta TORRE-SCHAUB | marta.torre-schaub@neuf.fr

CNRS - IDHES UMR 8533 - Université Paris 1 Panthéon-Sorbonne - Paris - France

Mots clés : droit, science, expertise, société, normes, prise de décision

Quels rapports entretiennent les sciences et le droit ? La réponse est loin d'être simple. On peut penser dans un premier temps que le droit appréhende les savoirs scientifiques afin de les utiliser dans une optique de production de textes normatifs. Le droit interagit également avec la science pour s'en instruire avant la prise de décision (administrative et/ou judicaire). A la lecture des deux articles ici présentés, les rapports entre la science et le droit apparaissent comme le résultat d'un enrichissement mutuel. Cette vision permettrait de sortir d'un mode relationnel à une seule voie pour entrer dans une dynamique de co-production et de coopération étroite

Les deux articles ici commentés montrent, chacun empruntant des raisonnements et des exemples différents, que si, certes, le droit se sert de la science pour nourrir sa fonction normative, la science peut aussi se servir du droit pour l'agencement de ses critères et méthodes de construction du savoir scientifique, par exemple dans l'élaboration d'expertises. Les articles ci-dessous analysés nous livrent ainsi des pistes pour un rapprochement des deux communautés. Une meilleure intégration du droit et de la science passe par une appréhension mutuelle des savoirs. Ce que disent les différents auteurs ici va justement dans ce sens. Ils expliquent de quelle manière la connaissance scientifique et le droit peuvent se rapprocher pour un enrichissement réciproque. Si les deux études sont très différentes, les deux proposent des analyses nouvelles des rapports entre la connaissance scientifique et le droit.

Le premier article développe un regard théorique large des relations entre le droit et la science. Il propose une relecture des rapports entre les deux permettant une appréhension mutuelle des connaissances. L'auteur expose des méthodes de coopération entre les sciences et le droit mettant les besoins de la société sur le devant de la scène et favorisant ainsi un rapprochement entre les deux sphères. C'est ce qu'elle appelle « la science en action », que l'on pourrait également traduire par « la science au service de ». L'auteur envisage ainsi les relations entre la science et le droit comme une manière de mettre les deux, à partir d'un véritable partenariat, au service des besoins de la société.

Le deuxième article observe les relations entre la production du savoir scientifique à travers les expertises et le droit. Il a ainsi un double objet : celui d'analyser les méthodes d'élaboration des expertises scientifiques puis celui d'étudier la manière dont elles sont utilisées par les tribunaux. Cet article expose ainsi les critères scientifiques utilisés par l'Agence pour la protection de l'environnement aux Etats-Unis (EPA) dans l'élaboration d'expertises scientifiques. Les auteurs proposent des méthodes d'élaboration des expertises suivant une série de grilles et de règles, pour une utilisation plus pertinente et efficace par les Cours de justice. Autrement dit, les auteurs soutiennent que les méthodes d'élaboration des expertises scientifiques fournies par l'EPA peuvent être améliorées si on introduit dans ces méthodes des critères normatifs (autrement dit, des critères régis par des règles standardisées et très précises). De cette manière, les juges, profanes quant aux connaissances scientifiques, seraient en mesure de mieux comprendre les connaissances scientifiques contenues dans les expertises.

Il est ainsi intéressant d'aborder ces deux articles qui proposent différentes approches sur la manière dont peuvent être envisagées les collaborations entre les sciences et le droit.

### Des vérités utiles : La science en action dans la loi et les politiques

**Sh.** Jasanoff, Serviceable Truths: Science for Action in Law and Policy, Texas Law Review, 2015, vol **93**, 1723

#### Résumé

Les relations entre la science et le droit sont devenues un sujet d'étude et de réflexion à part entière à partir notamment des dénommés Sciences and Law Studies. Etudier ces rapports, explique l'auteur consiste à offrir une vision conceptualisée, voire critique, des interactions entre le droit et la science. Dans ces liens entre les deux, explique l'article, il ne s'agit pas de savoir comment prendre les bonnes décisions. Il ne s'agit pas non plus de savoir comment développer un guide pratique portant sur la manière dont le

droit devrait utiliser la preuve scientifique et les avis des experts. Ce qui est montré dans cette étude est l'intérêt d'aller encore plus loin dans la réflexion sur les rapports entre les deux champs. L'article propose une manière d'envisager le partenariat entre la science et le droit en mettant les besoins de la société au premier plan. L'auteur explique ainsi comment les deux institutions (sciences et droit) peuvent opérer pour atteindre un concours plus efficace. La finalité serait, selon l'auteur, de collaborer ensemble dans une gouvernance au service de nos démocraties. Il s'agit ainsi, si l'on suit ce raisonnement, de penser à la manière d'exercer le pouvoir afin de prendre les bonnes décisions lorsqu'il y a une incertitude. Les incertitudes sont ici comprises dans un sens très large : à la fois scientifique, mais également normatif, voire, épistémologique. L'auteur part ainsi du fait que le savoir scientifique lui même n'est ni certain ni homogène et que le droit non plus ne possède de certitude normative quant à savoir quelle est par exemple la meilleure norme applicable à telle ou telle situation. Cela permettrait, en outre, nous dit Madame Jasanoff, de savoir comment lutter contre le tiraillement qui peut exister parfois entre les pressions conflictuelles à l'intérieur des savoirs scientifiques et les conflits existant également dans le monde du droit.

Cet article analyse ainsi ces rapports complexes en proposant ce que l'auteur nomme « une cascade de déférence » ou « grille à respecter ». Cette grille comporterait quatre points : l'objectivité, le consensus, la précaution et la subsidiarité. L'auteur passe ainsi en revue, à partir de ces quatre points, la manière dont le savoir scientifique est construit, qu'il soit destiné ou pas à un usage pratique pour le législateur. Il propose ensuite de porter un regard sur la manière dont la science est utilisée à des fins d'élaboration de la loi. C'est ce que l'auteur appelle la « science pour l'action ». Autrement dit, elle nous livre ici des pistes pour mieux utiliser le savoir scientifique dans la construction de la norme légale. Egalement, l'article propose d'effectuer un changement de perspective par rapport aux objectifs recherchés par les preuves scientifiques. L'auteur montre ainsi comment effectuer un tournant dans les rapports entre le droit et la science allant de ce qu'on appelle couramment « la vérité scientifique », vers ce qu'elle appelle « la vérité au service de». Les besoins de la société démocratique, dont une bonne gouvernance, seraient ainsi pour l'auteur l'objectif essentiel pour lequel la science et le droit devraient travailler la main dans la main.

#### Commentaire

L'article de Sheila Jasanoff pose la question de savoir quel degré d'importance et quel espace doit prendre le savoir scientifique et, en réalité, les revendications de la communauté scientifique, dans des contextes légaux spécifiques, sont effectivement des questions importantes et cruciales dans nos sociétés. L'auteur nous explique dans son article que nous vivons des crises diverses, sanitaires, environnementales et que nous apprenons tous les jours de l'existence des nouveaux risques tout en découvrant chaque jour des nouvelles avancées de la science et la technique. Dans ce contexte, si l'on suit l'auteur, il semble pertinent de s'interroger sur la manière d'améliorer le flux de connaissances scientifiques dans les procédures légales. L'article rappelle également qu'il ne faut pas minimiser la part de responsabilité du droit dans le maintien de l'ordre et de la stabilité dans des sociétés scientifiquement et technologiquement avancées tout en protégeant la liberté et la justice. Il s'agit, en essence, si l'on suit ce raisonnement, plutôt que d'essayer de rendre les juges plus compétents en matière scientifique et de faire d'eux des experts dans les principes et méthodes de la science, d'être plus attentif aux formes les plus adéquates de respect des méthodes scientifiques et juridiques.

L'auteur propose ensuite de se centrer dans un rapport dynamique entre la science et le droit qui serait celui de la « science pour l'action ». De cette façon le droit pourrait manier, pour ses finalités normatives, une « vérité utile », permettant de satisfaire les besoins de la société. Pour ce faire, l'auteur propose de se pencher davantage sur le rôle normatif du droit. Elle montre ainsi que le droit aurait une capacité plus grande à intégrer le contenu des expertises scientifiques et techniques si des critères clairs et stables d'utilisation des expertises scientifiques étaient imposés de manière plus générale. Des normes pré établies définiraient de manière précise la manière dont les connaissances scientifiques doivent être élaborées puis utilisées.

De la même manière, explique l'auteur, les chercheurs juristes spécialisés dans les sciences et les techniques, seraient mieux lotis pour entamer un dialogue plus fructueux avec les scientifiques. Cela permettrait que les juristes qui analysent les connaissances scientifiques via les différentes expertises, puissent mieux comprendre comment la science a été élaborée dans la pratique. Cette connaissance, quasiment sociologique sur la manière dont la connaissance scientifique s'élabore, permettrait également de déterminer la pertinence des questions que le droit doit poser à la science. Ainsi le juriste devrait pouvoir trouver réponse par exemple à la question de savoir si la connaissance scientifique fournie dans les expertises a été faite de manière objective, consensuelle, en tenant compte ou pas du principe de précaution ou encore de quelle manière les incertitudes sont intégrées. L'auteur avance ainsi la thèse, qui est la sienne, consistant à dire que plus le travail scientifique est normativisé (régit par des règles très précises) mieux armé sera le juriste pour savoir comment argumenter dans un processus de prise de décision. En résumé, plus on sait comment la science élabore son savoir et son expertise, mieux on pourra l'utiliser. C'est ce que l'auteur appelle un rapport entre science et droit « gagnantgagnant ».

### Repenser l'examen judiciaire des Agences d'expertise

E. Fisher, Pasky Pascual, W. Wagner, Rethinking Judicial Review of Expert Agencies, Texas Law Review, 2015, Vol 93, 1681

#### Résumé

Cet article expose les interrelations, dans le contexte judiciaire nord américain, entre le travail fourni par les agences d'expertise et les tribunaux de justice. Les auteurs expliquent que les tribunaux, afin de rendre des décisions de justice, opèrent un examen du travail des agences lorsque celles-ci fournissent des études et des expertises sur un sujet déterminé. Pourtant les juges ne possèdent pas forcément les connaissances nécessaires en matière scientifique et encore moins en matière de politique scientifique. Après analyse approfondie des choix scientifiques faits par certaines agences comme l'EPA (Environmental Protection Agency) dans l'élaboration des NAAQS (National Ambient Air Quality ou « seuils nationaux de la qualité de l'air ») les auteurs affirment qu'il apparaît que les Cours effectuent de plus en plus fréquemment un examen rigoureux du travail de ces agences. Cet examen, expliquent les auteurs, laisse entrevoir les débuts d'un partenariat entre les tribunaux et les agences dans la construction des politiques scientifiques applicables aux risques pour la santé de l'homme et l'environnement. Les tribunaux apparaissent ainsi comme un moteur à l'origine d'une obligation pour les agences de renforcer leurs modes de gouvernance ainsi que les

procédures de délibération scientifiques. De manière corrélative, les agences, en développant des processus décisionnels plus renforcés, produiront un impact positif par rapport aux standards et aux grilles d'analyse des tribunaux. De cette façon, les tribunaux et les agences semblent travailler ensemble et dans la même direction. A partir des efforts mutuels et coordonnés, conduisant à l'établissement d'analyses rigoureuses, ils peuvent guider mutuellement leurs processus de prise de décision. Les auteurs montrent que de l'examen attentif de la manière de procéder de certaines agences comme par exemple l'EPA dans l'élaboration des NAAQS, il est possible de voir apparaître un modèle normatif très précis, permettant de donner aux tribunaux un rôle déterminant, là où la prise de décision s'avère délicat

#### Commentaire

Les auteurs mettent en avant l'idée de la nécessité d'un travail collaboratif entre le droit et la science à partir de l'examen très concret du mode de fonctionnement des tribunaux aux Etats-Unis. Il s'agit d'un travail d'analyse qu'il convient de contextualiser, et ce pour deux raisons. Premièrement parce que le cadre est celui du fonctionnement des agences d'expertise et des tribunaux nord-américains. Deuxièmement dans la mesure où il est question d'expertises scientifiques fournies par des agences d'expertise, plus précisément encore des expertises fournies par l'EPA dans le cas de NAQQS.

Les auteurs exposent un certain nombre de cas judiciaires emblématiques pour mieux illustrer la manière dont les tribunaux ont utilisé les expertises. L'article montre ainsi comment les juges se sont saisis des règles utilisées par l'EPA pour construire leurs expertises. En effet, l'EPA a introduit dans l'élaboration de ses expertises, un certain nombre de critères standardisés pour mieux asseoir leur méthode expertale. Cette méthode, qualifiée de « normative » (dans la mesure où elle est fondée sur des règles précises et clairement établies), utilisée par les scientifiques de l'Agence Environnementale, a permis aux juges de mieux comprendre l'élaboration de critères scientifiques d'évaluation des risques par l'agence. Les auteurs soutiennent ainsi que le fait de mieux cerner ces outils et méthodes scientifiques dans l'élaboration des expertises, a conduit les juges à mieux intégrer et appréhender les connaissances scientifiques.

Enfin, expliquent les auteurs, une meilleure diffusion des méthodes et des règles utilisées par les agences d'expertise auprès du public mais surtout de la communauté juridique, permet aux juges de mieux fonder leurs décisions s'agissant des questions scientifiques tenant aux risques pour la santé et l'environnement.

Les auteurs vont même plus loin dans leur étude et observent qu'une élaboration plus réglementée des méthodes d'élaboration de la connaissance scientifique permet de rapprocher d'une manière générale, la communauté scientifique de la société elle-même. Les auteurs montrent ainsi qu'il y a une évolution positive dans la manière dont l'EPA a élaboré ses seuils, ce qui a contribué à clarifier le jugement des tribunaux en la matière. En effet, jusqu'aux années 2006 l'EPA avait pour habitude de fournir des expertises difficilement compréhensibles pour un non-

scientifique ce qui rendait leur lecture et leur interprétation très difficile. La prise de décision judiciaire était dès lors compliquée car les juges ne possédaient pas des véritables clés de compréhension d'un certain nombre de données scientifiques. A partir de 2006 les auteurs constatent une évolution positive. Ils expliquent que l'EPA a introduit depuis cette date des changements dans sa manière de faire. Des comités spécifiques et des sous-comités, chacun affecté à une tâche prédéfini et précise, devaient élaborer les seuils pertinents et justifier ensuite cette élaboration par rapport à des critères bien définis comme « la tolérance de la population », « le classement des certitudes et des incertitudes », « les marges d'erreur », « la raisonnabilité » (ou la part de raisonnable d'une argumentation) etc. A l'instar de l'élaboration de ces critères, lisibles par les non scientifiques, les décisions de justice ont, depuis 2006, été beaucoup plus argumentées et de ce fait mieux acceptées par la société. Les auteurs expliquent que cette évolution dans la gouvernance interne de l'EPA a contribué à une évolution du droit administratif dans le secteur de la santé publique et l'environnement. Ils exposent également qu'elle a contribué à faire évoluer le droit de la preuve dans le procès judiciaire en permettant une meilleure mobilisation des expertises scientifiques de l'agence de protection de l'environnement. D'une manière encore plus précise, cet article explique que les changements normatifs produits dans la gouvernance de l'EPA ont conduit notablement à un assouplissement du lien de causalité permettant beaucoup plus facilement de relier l'existence d'une substance polluante dans l'air à l'existence d'un risque pour la santé ou l'environnement. Cet assouplissement du lien de cause à effet, permet, rappelons-le, d'établir plus facilement les causes réelles et probables d'un risque et/ou d'un dommage. Cela permet également de pouvoir établir des responsabilités. Ces améliorations ont contribué de manière notable à une meilleure acceptation des décisions des tribunaux par la société.

#### **C**ONCLUSION GÉNÉRALE

Ces articles analysent, en adoptant des prismes différents, la question de la place du savoir scientifique dans la cité. Ce savoir semble s'entendre, à la lecture de ces deux articles, comme un facteur à la fois de rationalité dans la décision juridique et politique. Il va encore plus loin et s'étend même au mode de fonctionnement de la démocratie actuelle et de la séparation des pouvoirs face aux crises sanitaires et environnementales. En effet, les décisions politiques reposent en partie sur des composantes éminemment techniques et l'enrichissement progressif du corpus législatif nécessite que le juriste puisse acquérir des compétences scientifiques qu'il ne possède pas à la base. La légitimité de la décision juridique et politique doit ainsi impliquer un accès éclairée à un savoir scientifique. Ce savoir, qu'il soit envisagé d'une manière très générale comme le montre Sheila Jasanoff, ou qu'il soit très précis, comme le montre le deuxième article, doit, tel qu'il ressort de la lecture de ces études, être normativement organisé et répondre à une gouvernance préalablement établie. Ces articles fournissent des clés de compréhension sur les manières de rendre plus accessible le savoir scientifique au monde du droit.

#### GENERAL CONCLUSION

These articles analyze beyond relationships between the scientific expertise and the law, the question of the place square of the scientific knowledge in society as a factor of rationality of legal, political decision as well as the democracy and the division of powers. The political decisions indeed involve, eminently technical components and the progressive enrichment of the legislative corpus requires, that the jurist can acquire scientific skills which he does not possess. The legitimacy of the legal and political decision has to rely upon an access enlightened in a scientific knowledge organized, answering a beforehand established governance. These articles seem to give the keys of understanding the way to reconcile a right of decision and the necessity of an expertise which in fact is not easily legible nor usable by the jurist and the decisionmaker.

#### Lexique

**Normatif**: de l'ordre des normes, ces dernières étant constitutives de modèles de comportements indiquant une conduite appropriée.

Ainsi conçue, la norme a une fonction à la fois évaluative et prescriptive.

**Expertise**: Dispositif d'aide à la décision, par la recherche des faits techniques ou scientifiques, dans des affaires où le décideur se confronte à des questions hors de sa portée directe.

**Réglementation**: action de prendre des règlements et résultat de cette action, par opposition à la notion de régulation, la réglementation est volontiers entendue comme strictement juridique.

**Epistémologie**: Discipline qui prend la connaissance scientifique pour objet

**EPA Environmental Protection Agency**: Agence américaine de protection de l'environnement, est une agence indépendante du gouvernement américain qui a pour fonction de protéger la nature et la santé des citoyens des Etats Unis.

NAAQS National Air Ambient Quality Standards: Le Clean Air Act a exigé dans sa rédaction de 1990 que l'EPA rédige et établisse des seuils nationaux de qualité de l'air pour toutes les substances répertoriées comme polluantes et considérées dangereuses pour la santé publique et l'environnement.

Raisonnabilité: Qui est conforme aux principes de bon sens, de l'équité. Ce qui est suffisant, convenable, acceptable.

Subsidiarité: Option qui privilégie le niveau inférieur d'un pouvoir de décision aussi longtemps que le niveau supérieur ne peut pas agir de manière plus efficace

#### Publications de référence

- P. Rosanvallon, Science et démocratie, Paris, Odile Jacob, 2014
- C. Delmas, Sociologie politique de l'expertise, Paris, La Découverte, 2011
- D. Pestre, A contre-Science, Paris, Seuil 2013
- S. Jasanoff, States of Knowledge, Routledge, 2006
- **A. Rosenberg**, M. Halpern, Reinvigorating the Role of Science in Democracy, PLOSBiology.org, May 2013, vol **11**

#### Liens d'intérêts :

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt

#### Comité Éditorial

Catherine DEMAILLY-MULLIE : Enseignant-chercheur - Faculté de pharmacie d'Amiens

Nathalie HERLIN: CEA-CNRS - Laboratoire Francis Perrin (URA 2453), Gif/Yvette Michel HERY: INRS - Direction générale - Mission Veille et prospective, Paris

Lionel LAFAY: INCa - Département Observation, veille et évaluation, Boulogne-Billancourt

Hélène GOULARD : InVS - Département Santé Travail, Bordeaux

Caroline MARTIN et Valérie PAGNEUX: Irstea – Dir. de la prospective, de la veille, de la valorisation de l'information

scientifique et technique, Antony

Anne MASSON: ANSM - Agence nationale de sécurité des médicaments et des produits de santé, Saint-Denis

Nathalie VELLY: Ineris - Direction des risques chimiques, Verneuil-en-Halatte

#### Relecteurs

Claude ALABOUVETTE: Membre du comité d'experts spécialisé « Risques biologiques pour la santé des végétaux », Dijon

Karine ANGELI: Anses – Dir. évaluation des produits réglementés, Maisons-Alfort

Claire BEAUSOLEIL: Anses – Dir. évaluation des Risques, Maisons-Alfort

Nathalie BONVALLOT: Institut de recherche sur la santé, l'environnement et le travail (Irset), Rennes

Guillaume BOULANGER: Anses – Dir. évaluation des risques, Maisons-Alfort

Nancy BOURGEOIS: Audioprothésiste, Alforville

Francisco CABELLO-HURTADO: UMR-CNRS Ecosystèmes, Biodiversité, Evolution, Université de Rennes 1

Yves CAZALS: CNRS-Laboratoire des neurosciences intégratives et adaptatives (LNIA), Marseille

David GARON: Dépt de botanique, mycologie et biotechnologies - UFR des sciences pharmaceutiques, Caen

Nelly GOURLAOUEN: Anses – Dir. évaluation des produits réglementés, Maisons-Alfort

Céline GUEGUEN: Centre interprofessionnel technique d'études de la pollution atmosphérique (Citepa), Paris

Laïla LAKHAL : Inra, UMR Toxalim, Toulouse Patrick THONNEAU: Inserm, Toulouse

**Christophe MURITH :** Division radioprotection de l'Office fédéral de la santé publique, Berne (CH) **Michel PELANDAKIS :** Institut des sciences pharmaceutiques et biologiques, UMR-CNRS 5240, Lyon

Emmanuel RIVIERE : Association pour la surveillance et l'étude de la pollution atmosphérique en Alsace (APSA)-Atmo

Schiltigheim

Gilles RIVIERE: Anses – Dir. évaluation des risques, Maisons-Alfort

Annie SASCO: Inserm, Bordeaux

Lang TRAN: Institute of Occupational Medicine (IOM), Edinburgh (UK)

Emmanuelle VUILLET: Institut des sciences analytiques, Lyon

Pascal WILD: INRS, Vandoeuvre-lès-Nancy

#### **Coordination - Anses**

**Directeur de publication :** Roger GENET **Rédactrice en chef :** Anne TILLOY

Comité de rédaction : Anne TILLOY, Louis LAURENT, Gérard LASFARGUES

Responsable de l'édition : Fabrice COUTUREAU

Assistante d'édition: Aurélie PAJON, Aude ESTEVE, Céline LETERQ

Le Bulletin de veille scientifique de l'Anses (BVS) est un recueil de notes en français revues par les pairs, dans lesquelles des experts en santé-environnement, santé-travail, font une analyse critique de deux à trois publications internationales parues pendant une période de veille récente de quelques mois. L'auteur présente dans chaque note une introduction générale de la problématique, suivie pour chaque publication, d'un résumé et d'un commentaire dans lequel les points pertinents sont analysés. Enfin, une conclusion générale fait le lien entre les publications choisies, et propose une mise en perspective des résultats.

Le *BVS* produit en collaboration avec le réseau des partenaires de l'Anses, a pour objectif principal de diffuser une information actualisée et validée en appui aux politiques publiques. Il s'adresse à tous, décideurs, chercheurs, représentants du milieu associatif ou entrepreneurs.

