anses
agence nationale de sécurité sanitaire
alimentation, environnement, travail

Connaître, évaluer, protéger

Bulletin de veille Scientifique

Édition scientifique • Bulletin de veille n° 31 • Mars 2017
Notes d'actualité scientifique

Santé / Environnement / Travail

Le Bulletin de veille scientifique *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. C'est le cas du développement de nouveaux outils destinés à la détection de nanoparticules dans l'eau potable et dans l'alimentation, traité dans la première note de ce bulletin, qui fait écho aux travaux publiés récemment par l'Inra sur le dioxyde de titane.*

Plusieurs notes ciblent des avancées réalisées dans les domaines régulièrement traités dans ce bulletin, comme l'exposition aux perturbateurs endocriniens (PE) et les effets combinés des substances chimiques. Il est ainsi montré que, lors d'une campagne de sensibilisation faite auprès de jeunes filles, la non utilisation de crèmes et autres produits cosmétiques contenant des phtalates, parabènes et triclosan, réduit significativement la quantité de ces substances détectées dans les urines. Il est aussi montré que certaines substances ayant des propriétés PE ont une incidence sur le métabolisme du glucose et des lipides, et peuvent contribuer au déclenchement du diabète de type 2 et à l'obésité.

Une des notes présente des travaux sur la contamination d'eaux de surface, résultant de la fracturation hydraulique, technique qui utilise des substances ayant des propriétés de perturbateurs endocriniens.

Les maladies infectieuses restent à l'ordre du jour. Ainsi l'année 2016 a connu une préoccupation majeure de santé publique, avec l'apparition de microcéphalies, consécutives à une exposition des fœtus au virus Zika au cours du premier trimestre de gestation. Deux notes font état de publications relatant l'utilisation de techniques de biologie moléculaire au service d'une meilleure compréhension de diffusion des microorganismes dont Zika et aussi Tuberculosis bovis*, pour ce qui concerne le transfert de contamination bovine à l'Homme.*

Gérard Lasfargues

Agents physiques 7

Détection de nanoparticules manufacturées dans l'eau potable et les additifs alimentaires 8

Yann SIVRY

De l'utilisation accrue depuis dix ans des nanoparticules (NPs) manufacturées, dans des domaines multiples, découle une inévitable dissémination des NPs et une potentielle exposition de l'Homme. Les aliments, ainsi que l'eau de boisson, sont parmi les principaux vecteurs d'exposition identifiés et il apparaît indispensable de rechercher la présence de NPs dans les produits de consommation et donc de développer des outils et des démarches analytiques adaptés. Dans ce contexte, l'article de Donovan et al. vise à évaluer, par la technique de la spICPMS, l'efficacité des procédés de traitement de l'eau potable pour éliminer les NPs de dioxyde de titane, d'or et d'argent. La publication de Barahona et al. propose une approche systématique originale et multi-technique, afin de détecter la présence de nanoparticules de silice amorphe dans une sélection d'échantillons d'additifs de grade alimentaire.

Toxicité de la cellulose nanométrique : des incertitudes persistent 13

Ludwig VINCHES et Stéphane HALLE

D'origine naturelle et peu chère à produire, la nanocellulose jouit d'un prestige grandissant auprès des industriels et des chercheurs. Ses propriétés biologiques en ont fait une candidate de choix dans le milieu de la santé. Alors que certains travaux relatifs à la toxicité de différentes formes de nanocellulose ont conclu à sa non-dangerosité, d'autres études sont plus réservées. Bien que dans tous les cas la toxicité reste faible, elle n'est pas nulle et certains facteurs, comme l'origine de la cellulose mère et le processus de synthèse de sa forme nanométrique, pourraient modifier les résultats. En milieu liquide (majorité des études sur la toxicité des nanoparticules) ou sous sa forme aéroportée, la nanocellulose est sujette à une agglomération qui peut aussi modifier considérablement ses propriétés biologiques. Cette note souligne la nécessité de poursuivre la recherche sur la toxicité de ces nanoparticules.

Agents chimiques 17

Présence de perturbateurs endocriniens, au niveau placentaire et dans des produits à usage cosmétique 18

Patrick THONNEAU

La présence dans les produits cosmétiques de composés chimiques, phtalates, parabènes, triclosan, phénols, susceptibles d'avoir des effets délétères de type « perturbateurs endocriniens » est une préoccupation croissante de santé publique faisant l'objet de nombreuses publications internationales. Dans cette note, la première publication montre qu'un programme d'éducation et de sensibilisation mené chez des adolescentes, avec l'éviction pendant trois jours des crèmes et soins de corps contenant des phtalates, parabènes, triclosan, et phénols, a permis de réduire significativement la quantité de ces mêmes produits dans leurs urines.

La seconde étude montre la présence significative de parabène et de benzophénone au niveau placentaire, attestant d'une possible exposition intra-utérine à ces deux familles chimiques.

Etude de l'exposition aux mélanges binaires de perturbateurs endocriniens 21

Radhouane CHAKROUN

La population générale est exposée à de nombreux perturbateurs endocriniens et/ou reprotoxiques. Les effets individuels de la majorité de ces substances ont fait l'objet d'études toxicologiques. Cependant, dans les conditions réelles, l'homme peut être exposé à un mélange de composés nocifs pour sa santé. Cette note décrit deux études sur l'exposition simultanée aux mélanges binaires de certains de ces composés qu'on trouve dans notre environnement voire dans notre alimentation et dans certains produits de consommation courante.

Ecotoxicité et comportement environnemental des lanthanides 24

Davide A.L. VIGNATI

L'utilisation croissante des lanthanides dans plusieurs secteurs économiques (énergies vertes, électronique, applications médicales) fait que l'on s'interroge sur leur écotoxicité. Même si des études en conditions contrôlées montrent des effets biologiques, les connaissances actuelles ne permettent pas de définir des normes de qualité environnementale correspondantes. Les interactions des lanthanides avec d'autres agents de stress

ou les changements dans leur spéciation (*i.e.*, l'ensemble des formes chimiques que peut prendre un élément dans une matrice environnementale) doivent aussi être pris en considération pour garantir une utilisation de ces éléments sans effets néfastes sur l'environnement.

Fracturation hydraulique : quel risque pour les générations futures ? 27

Catherine VIGUIE

Cette note traite des dangers de la contamination des ressources hydriques par des perturbateurs endocriniens et/ou des substances reprotoxiques à partir de fluides ou d'eaux usées provenant de fracturation hydraulique de la roche, un procédé utilisé pour atteindre des ressources en énergie fossile jusque-là inaccessibles. Une méthode de priorisation des molécules utilisées en vue de futures évaluations toxicologiques est proposée, et repose sur leurs propriétés reprotoxiques dans un contexte de contamination de ressources hydriques. La deuxième approche apporte des éléments de preuves biologiques qui montrent que ce procédé peut conduire à la contamination d'eaux de surface par des substances ayant des propriétés antagonistes de récepteurs endocriniens. Ces données sont autant de signaux alertant sur la nécessité de développer une évaluation scientifique objective et pragmatique de ce risque.

Nouvelle approche métabolomique appliquée à la mesure de l'exposition aux faibles doses de contaminants chimiques : incidence des pesticides et POP sur l'obésité et le diabète de type 2 31

Jean-Christophe GARRIGUES

L'utilisation des méthodologies métabolomiques permet d'identifier les métabolites présents dans une cellule ou un tissu, et qui apparaissent après une exposition à de faibles doses d'agents chimiques. Deux approches sont applicables : l'une ciblée pour identifier les effets d'un grand nombre de contaminants sur des signaux cellulaires ou enzymatiques précis, ou l'autre non ciblée pour identifier les métabolites impliqués dans l'exposition à un petit nombre de polluants. L'approche métabolomique permet d'identifier les récepteurs spécifiques des agents chimiques et complète l'étude des effets épidémiologiques ou toxicologiques. Les deux études présentées dans cette note montrent les effets d'une exposition aux pesticides OC, OP et aux POP sur le métabolisme du glucose et des lipides. Cette voie de signalisation perturbée suggère une influence de ces contaminants dans l'épidémie de diabète de type 2 et l'obésité.

Agents biologiques 37

Impact sur le neurodéveloppement de l'infection *in utero* par le virus Zika 38

Laetitia DAVIDOVIC

Le cerveau fœtal est particulièrement vulnérable aux agressions de l'environnement. Notamment, l'exposition *in utero* à des agents infectieux est un facteur de risque important de troubles du neurodéveloppement. Les travaux repris dans cette note montrent une association statistique forte entre l'infection de la mère par le virus Zika et la microcéphalie chez le nouveau-né. De plus, ces travaux supportent la notion de fenêtre développementale de vulnérabilité pendant laquelle l'infection par Zika peut menacer le cerveau fœtal. Cette fenêtre correspondrait au 1er trimestre de la gestation, période où les progéniteurs neuraux se multiplient pour former le cerveau en développement. Ceci renforce l'importance de mener des campagnes d'éradication du moustique-vecteur de Zika dans les zones exposées et des campagnes de sensibilisation ciblant particulièrement les femmes en âge de procréer.

Utilisation des phylogénies d'infections en épidémiologie 42

Samuel ALIZON et Emma SAULNIER

Les virus évoluent rapidement. C'est une menace pour la santé publique, mais aussi une chance pour les épidémiologistes car la façon dont les virus se propagent peut laisser des traces dans leur génome. La phylodynamique permet d'analyser des données de séquences virales pour inférer des paramètres épidémiologiques (vitesse et routes de propagation) par le biais d'arbres phylogénétiques. Ces approches sont en plein essor grâce à l'efficacité informatique et à l'explosion de la quantité de séquences disponibles, dûes aux technologies de séquençage de plus en plus performantes. Les défis actuels se situent au niveau méthodologique afin de pouvoir complexifier les modèles sous-jacents et analyser des jeux de données plus imposants.

Qualité des milieux 47

Dynamique de transmission et facteurs de risque de la tuberculose à *Mycobacterium bovis* chez l'homme et l'animal : un problème global..... 48

Sylvain GODREUIL

La tuberculose bovine (bTB), dont l'agent étiologique est *Mycobacterium bovis (MB)*, demeure un problème majeur de santé publique et animal dans les pays du Sud, et reste un problème de santé vétérinaire coûteux et imparfaitement contrôlé dans les pays industrialisés. Le réservoir principal de MB est l'animal infecté, contaminant les animaux sains et l'homme, essentiellement par transmission indirecte (environnement et lait contaminés par les animaux malades) et direct par aérosol. Cependant le rôle des matrices environnementales comme réservoir de contamination des animaux, ou encore, la transmission aérienne interhumaine, restent des modes de transmission de MB peu explorés et mal documentés. L'article Barbier et al. (2016) démontre pour la première fois, en milieux naturel d'élevage, la présence de MB par une méthode moléculaire (PCR), validant ainsi, l'hypothèse que les matrices environnementales pourraient constituer un réservoir et/ou une source de transmission de MB vers les animaux. L'article de Buss et al. (2016) met en évidence la difficulté de confirmer et de documenter les liens épidémiologiques des cas de TB à MB liés à une transmission aérienne interhumaine. Dans ce cadre, les auteurs préconisent une approche combinée d'épidémiologie de terrain et génétique avec un séquençage de génome complet systématique pour l'ensemble des isolats de MB retrouvés chez les patients et les animaux. Seule, cette stratégie d'épidémiologique génétique, permettrait une compréhension fine de la transmission et de la circulation des génotypes de MB, ainsi qu'un meilleur contrôle de cette maladie.

Pathologies..... 53

Le stress oxydatif est-il responsable de la toxicité des mycotoxines sur le système reproducteur mâle ?..... 54

Myriam BOUSLAMA

Les mycotoxines sont des substances toxiques secrétées par des moisissures qui peuvent contaminer les aliments. Chez l'animal, certaines d'entre elles ont des effets sur la reproduction mâle mais les mécanismes ne sont pas bien connus. Les articles analysés dans cette note montrent des effets toxiques de la zéaralénone, la déoxynivalénol et la toxine T2 sur les cellules de Leydig, et une altération de la stéroïdogenèse dont ces cellules sont responsables, même à des concentrations n'affectant pas leur viabilité. Des molécules antioxydantes permettent de diminuer les effets toxiques, suggérant que le stress oxydatif joue un rôle majeur dans cette cytotoxicité. En revanche, elles ne permettent pas de restaurer une stéroïdogenèse normale. D'autres mécanismes pourraient être impliqués dans l'altération de la stéroïdogenèse provoquée par ces mycotoxines.

Influence des polluants environnementaux sur l'incidence des troubles neurologiques : deux méthodes d'évaluation à grande échelle de la neurotoxicité développementale des produits chimiques 58

Agnès PETIT-PAITEL

Certaines substances chimiques présentes dans l'environnement ont des effets nocifs sur la santé en ciblant différents organes dont le cerveau, induisant une altération des capacités cognitives et la survenue de troubles neurologiques. En particulier, l'observation de la très forte progression de l'incidence de l'autisme dans le monde fait suspecter l'implication probable des produits chimiques. De ce fait, il est absolument crucial de développer et de mettre en place de nouveaux outils d'analyse qui permettent de mieux évaluer les effets d'une exposition à certains types de molécules chimiques, même lorsque cette exposition se fait à des niveaux très faibles. Les deux articles sélectionnés présentent des méthodes et des modèles différents pour mettre en évidence parmi un grand nombre de molécules celles présentant des effets toxiques développementaux sur des neurones en culture ainsi que pour identifier d'éventuels traitements.

Exposition des professionnels médicaux aux rayonnements ionisants et risque de cancer 62

Helene BAYSSON

Les effets à long terme des rayonnements ionisants à faibles et moyennes doses restent débattus. Les professionnels de santé, qui figurent parmi les personnels les plus fréquemment exposés aux rayonnements ionisants, font actuellement l'objet d'un suivi épidémiologique dans plusieurs pays en Europe, aux Etats-Unis et en Chine. Deux études ont été publiées très récemment : une étude menée aux Etats-Unis et une étude menée en Chine.

Dans la première étude, les auteurs observent un doublement du risque de décès par cancer du cerveau chez les manipulateurs de radiologie qui effectuent des procédures interventionnelles guidées par fluoroscopie. Dans la deuxième étude, les auteurs montrent une association significative entre l'incidence de cancers solides chez les travailleurs médicaux et l'exposition aux rayonnements ionisants. Dans ces deux études, la période d'exposition retenue est ancienne.

Impact des polluants persistants sur la différenciation des cellules souches embryonnaires et intestinales adultes 66

Benoit MIOTTO et Nadège GUINOT

Les travaux analysés dans cette note montrent, une nouvelle fois, l'effet inhibiteur de la signalisation d'AHR sur la différenciation des cellules souches (embryonnaires et intestinales adultes), avec des conséquences possibles sur l'émergence de certaines maladies comme le cancer ou l'inflammation du colon. La première étude caractérise une nouvelle catégorie de cibles génomiques pour AHR, et ses ligands, les séquences répétées. Peu étudiées, ces dernières pourraient expliquer les liens entre l'exposition à certains polluants et une susceptibilité accrue à certains cancers. La seconde étude, au niveau de l'intestin, indique que l'activation de la signalisation AHR perturbe le renouvellement cellulaire, ce qui pourrait entraîner l'accumulation de dommages et lésions dans les cellules intestinales et l'émergence de pathologies, comme le cancer.

Risques sanitaires et société 71

Pollution de l'air en ville et impact sur la santé de populations vulnérables 72

Gilles MAIGNANT

La pollution de l'air représente le premier impact sur la santé, mais l'amélioration de la qualité de l'air passe par différents stades. Que ce soit par la quantification précise de l'exposition (tabac, particules), son rôle sur le système respiratoire (en particulier la toux) ou par une meilleure acceptation par les populations (globale et à risque) ; de nouveaux leviers communicationnels et décisionnels (aménagement, transports, politiques publiques) doivent être mis en place. En effet, si la quantification de la qualité de l'air est maintenant bien documentée, l'exposition individuelle à laquelle est soumis chaque individu est encore très mal estimée car les itinéraires individuels (génétiques, espaces de vie, déplacements) sont peu documentés. L'appropriation par les citadins de mesures décisionnelles de réduction de la pollution de l'air nécessite une nouvelle forme de communication (bulletins météos ou autres).

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

anses
agence nationale de sécurité sanitaire
alimentation, environnement, travail

Connaître, évaluer, protéger

Bulletin de veille scientifique

Édition scientifique • Bulletin de veille n° 31 • Mars 2017
Notes d'actualité scientifique

Agents physiques

Détection de nanoparticules manufacturées dans l'eau potable et les additifs alimentaires

Yann SIVRY | **sivry@ipgp.fr**

Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité - Institut de physique du globe de Paris, UMR 7154, CNRS - Paris

Mots clés : **Additif alimentaire, détection, élimination, silice, single-particle ICPMS, nanoparticule, traitement de l'eau potable, techniques analytiques**

Les nanoparticules (NPs) manufacturées ont été développées et utilisées au cours de la dernière décennie dans de nombreux domaines, allant de l'optique jusqu'à la remédiation environnementale, en passant par l'électronique, les produits ménagers, les cosmétiques ou encore les produits de santé (1). Sur la base de la définition des nanomatériaux proposée par l'Union européenne (2), les NPs sont reconnues comme ayant au minimum une dimension dans la gamme 1-100 nm (3). La production de produits contenant des NPs augmente année après année, et on estime que ce marché devrait atteindre les 3000 milliards de dollars US en 2020 (4). Il en découle une inévitable dissémination des NPs dans le milieu naturel (5) et une potentielle exposition de l'homme. Le secteur agro-alimentaire est parmi les principaux vecteurs d'exposition identifiés (6) : les aliments, ainsi que l'eau de boisson, peuvent contenir de façon volontaire ou non des NPs manufacturées et donc impacter directement l'homme.
Il faut disposer des outils nécessaires « en aval » pour détecter et mesurer leur présence dans les produits de consommation courante tels que l'eau. L'enjeu est donc d'importance en termes de santé publique dans la mesure où l'on ne connait pas les effets à très long terme de cette exposition sur l'homme. D'autre part, les enjeux de la détection sont clairement posés « en amont » pour les producteurs dans le cadre de la mise en œuvre de la Réglementation européenne REACH (voir pour cela la page de la commission européenne: http://ec.europa.eu/environment/chemicals/).
Dans ce contexte, il apparaît indispensable de rechercher la présence de nanoparticules dans les produits de consommation ingérés par voie orale, mais aussi de développer des outils et des démarches analytiques permettant de lever les verrous de la nanométrologie (concentrations de l'ordre du bruit de fond analytique, présence naturelle des éléments constitutifs des NPs).
Les articles de recherche sélectionnés ici répondent à ces attentes : l'étude réalisée par Donovan et al. vise à évaluer, par la technique de la spICPMS*, l'efficacité des procédés couramment utilisés dans le traitement de l'eau potable pour éliminer les nanoparticules de dioxyde de titane, d'or et d'argent. Barahona et al. proposent quant à eux une approche systématique originale et multitechnique, afin de détecter la présence de nanoparticules dans une sélection d'échantillons d'additifs de silice amorphe de grade alimentaire (réf. E551).

Caractérisation par spICPMS de nanoparticules de dioxyde de titane, argent et or au cours du traitement de l'eau potable

Donovan AR. et al. (2016). Single particle ICP-MS characterization of titanium dioxide, silver and gold nanoparticles during drinking water treatment. Chemosphere, vol 144: p148-153.

Résumé

Dans cette étude, Donovan et al. évaluent l'efficacité des traitements conventionnels pour éliminer les nanoparticules de l'eau potable. Les principales étapes du traitement de l'eau potable sont reproduites en laboratoire (adoucissement à la chaux*, coagulation à l'alun*, adsorption sur charbon actif*, filtration puis désinfection à l'hypochlorite de sodium). Les nanoparticules considérées sont le dioxyde de titane (TiO_2NPs), d'argent (AgNPs) et d'or (AuNPs) contenues dans les eaux de surface (rivière Missouri). Pour cela ils utilisent la technique de comptage individuel de nanoparticules par ICPMS (spICPMS*), qui permet de déterminer les concentrations en métal dissous et en nombre de NPs ainsi que leur distribution en taille. Les limites de détection en taille sont calculées à 27-30 nm, 21-23 nm et 65-70 nm pour Au, Ag et TiO_2, respectivement.
Les auteurs montrent tout d'abord que des particules contenant du titane, modélisées en spICPMS sous forme de nanoparticules de TiO_2 sphériques, sont présentes dans l'eau de la rivière Missouri, mais pas de AuNPs ni de AgNPs. Dans un second temps, ils ajoutent dans l'eau non traitée des NPs manufacturées de Au, Ag et TiO_2 de tailles 100 nm, 100 nm et 160 nm respectivement.
Les résultats obtenus en spICPMS montrent une augmentation de la taille moyenne des TiO_2NPs après ajout de TiO_2 manufacturées à l'eau naturelle (pic élargi après 160 nm), ce qui indique une agrégation de ces particules. En revanche la taille des AuNPs et AgNPs ne change pas une fois disséminées dans l'eau brute. Le premier traitement à la chaux élimine une majorité des NPs de TiO_2, Ag et Au. Cependant, des TiO_2NPs de ~73 nm et AgNPs de 34 nm demeurent. La coagulation à l'alun suivie de l'adsorption sur charbon actif diminue encore le nombre de particules présentes, tandis que la filtration et la désinfection n'ont pas d'effets observables sur les concentrations en NPs.

Enfin, Donovan et al. recherchent la présence de Ti, Ag et Au sous formes dissoutes ou nanoparticulaires en conditions réelles du traitement de l'eau potable : les eaux de trois usines de traitement d'eau potable du Missouri sont analysées par spICPMS avant et après traitement. Alors que ni l'argent ni l'or ne sont détectés sous aucune forme, ni en entrée ni en sortie des trois usines, des TiO_2NPs sont systématiquement détectées. Il est à noter que les traitements réalisés par les trois usines permettent de réduire de plus de 90% les TiO_2NPs présentes initialement.

Commentaire

A l'heure actuelle, peu d'études ont abordé la question de l'élimination des NPs contenues dans les eaux potables ou usées et donc leur retour/dissémination dans le milieu naturel : l'étude proposée par Donovan et al. est en ce sens extrêmement novatrice. Les traitements conventionnels de l'eau sont-ils efficaces pour détecter et éliminer les nanoparticules ? Ces auteurs examinent par spICPMS l'efficacité des traitements conventionnels de l'eau potable pour éliminer les NPs de TiO_2, Ag et Au. Leurs résultats semblent démontrer que l'adoucissement à la chaux est l'étape qui permet d'éliminer la plus importante fraction de NPs, tandis que les étapes suivantes de coagulation à l'alun et d'adsorption sur charbon actif permettent d'éliminer la fraction de NPs restante.

Ces résultats très encourageants sont basés sur l'observation, mais on peut regretter que les auteurs n'aillent pas jusqu'à l'interprétation des processus physico-chimiques impliqués. Par exemple, l'adoucissement à la chaux provoque la précipitation de carbonates (de calcium, de magnésium...) mais aussi une forte élévation du pH>9,5-10. Il est peu probable que cela génère la dissolution des NPs, bien que les auteurs observent ensuite une taille moyenne plus faible pour TiO_2NPs et AgNPs (de 160 nm à 73 nm et de 100 nm à 34 nm, respectivement) sans pour autant l'expliquer. En effet le TiO_2 est habituellement dissout dans de l'acide fluorhydrique. Le processus à l'œuvre est sans doute une co-précipitation des NPs avec les carbonates, ce qui mériterait d'être approfondi. La coagulation doit, quant à elle, certainement permettre une hétéro-agrégation des NPs avec les flocs formés, suivie d'une sédimentation/filtration pour éliminer cette phase solide. L'adsorption sur charbon actif est un phénomène contrôlé par les forces de dispersion de London, un des nombreux types de d'interactions de van der Waals*. Concrètement, une substance polaire (soluble dans l'eau) est très mal supprimée par le charbon actif, alors qu'une substance non polaire peut être totalement supprimée. Or, la majorité des NPs manufacturées sont enrobées d'un surfactant qui définit leur caractère polaire ou apolaire. En conséquence, un même type de NPs peut se retrouver très, ou très peu, adsorbé par du charbon actif, selon la qualité polaire ou apolaire de son enrobage.

Cette étude met donc en lumière la nécessité de comprendre les processus physico-chimiques à l'œuvre à chaque étape du traitement de l'eau. Ces perspectives sont très prometteuses car elles ouvrent la voie à d'autres recherches sur la compréhension de l'efficacité et des limites de chaque processus de traitement conventionnel de l'eau, ce qui permettra d'élaborer à chaque étape de traitement une détection efficace sur un spectre large de NPs, tel que requis par l'UE.

http://ec.europa.eu/environment/chemicals/nanotech/).

Une approche multi-méthodes pour la détection et la caractérisation de nanoparticules de silice amorphe de qualité alimentaire

Barahona F. et al. (2016). Multimethod approach for the detection and characterization of food-grade synthetic amorphous silica nanoparticles. J of Chromato A. vol.1432: p92-100**.**

Résumé

Barahona et al. proposent ici de détecter et caractériser les NPs de silice amorphe synthétique (SAS, SiO_2) contenues dans onze additifs de qualité alimentaire par l'utilisation séquencée et détaillée de plusieurs méthodes analytiques : Diffusion Dynamique de la Lumière* (DLS), Diffusion Multiangle de la Lumière* (MALS), Spectrométrie de Masse Couplée à un Plasma Induit (ICPMS), Flow Field Flow Fractionation asymétrique* (A4F) et Microscopie Electronique en Transmission* (MET). La séquence analytique établie pour chaque échantillon est la suivante : 1) préparation de la suspension aqueuse et mesure par DLS ; 2) filtration et mesure du filtrat par DLS ; 3) analyse du filtrat par A4F-MALS ; 4) analyse du filtrat par A4F-ICPMS ; 5) observation des suspensions au MET.

Les résultats montrent que la DLS n'est efficace que pour donner une information rapide mais préliminaire sur la distribution en taille des particules. En effet, la qualité des résultats est fortement influencée par la vitesse de sédimentation des agrégats et des agglomérats, dont la présence masque celle des NPs seules. L'A4F permet le fractionnement des particules en fonction de leur diamètre hydrodynamique. En la couplant à un détecteur de type MALS, il est ainsi possible d'obtenir la répartition par catégorie de taille des particules. Cependant, pour des échantillons de particules hautement polydispersées en taille, tels que les SAS, l'apport de l'A4F-MALS est assez limitée en raison du gradient de taille en sortie de l'A4F. En revanche, le couplage A4F-ICPMS précédé d'une calibration en taille de l'A4F avec des standards de SiO_2NPs monodispersées permet aux auteurs de détecter et quantifier des SiO_2NPs (<100 nm) dans dix des onze additifs testés. Finalement, l'utilisation du MET pour observer les suspensions permet l'obtention de résultats sur la gamme de taille la plus large (y compris des échantillons non filtrés) et de confirmer que l'ensemble des onze échantillons contiennent des NPs primaires ou même des agrégats de NPs de taille <100 nm.

Commentaire

En combinant de nombreuses techniques analytiques, Barahona et al. proposent une démarche structurée et cohérente ayant pour but la détection de particules de taille nanométrique dans des additifs alimentaires code E551 (silice amorphe). Cette détection est un résultat probant, mais finalement peu surprenant en soi: les voies de synthèse de ces additifs n'étant pas calibrées pour produire spécifiquement des particules de taille soit supérieure soit inférieure à 100 nm, les produits obtenus présentent logiquement un

gradient de taille, allant du nano au micro. De la même façon, l'observation au microscope d'un sable naturel révèlerait dans la plupart des cas une telle hétérogénéité en taille.

Par ailleurs, les conclusions proposées par Barahona et al. quand aux forces ou aux faiblesses de chacune des techniques analytiques étudiées sont déjà, pour la majorité, clairement établies dans la littérature (7). Il est aussi fréquemment admis qu'aucune des techniques analytiques aujourd'hui disponible ne permet, utilisée seule, de caractériser un produit comme "nano", selon la définition donnée par l'Union Européenne (voir ci-dessous). Comme le soulignent à juste titre les auteurs, toutes les techniques analytiques utilisées ne peuvent que servir de "test positif", autrement dit, elles peuvent révéler la présence de NPs, mais non garantir leur absence.

Finalement, c'est la démarche proposée qui constitue le principal apport de ce travail. En effet, une approche analytique méthodique, structurée et systématique, combinant des techniques adaptées mais surtout utilisées dans un ordre logique, est une chose moins fréquente qu'on pourrait le penser. Or, les aliments sont avec les matrices environnementales ou biologiques parmi les matériaux les plus complexes à analyser et de telles démarches sont indispensables pour espérer relever le défi de la détection des NPs dans ces milieux.

Conclusion générale

Développer notre capacité à détecter la présence de nanoparticules manufacturées dans les produits alimentaires de consommation courante apparaît aujourd'hui essentiel au vu des flux estimés de ces objets et de leurs effets potentiels sur la santé. Afin de définir un cadre, l'Union européenne (UE) à proposé la définition suivante pour le terme "nanomatériau": "Un matériau naturel, accidentel ou manufacturé contenant des particules individuelles ou agrégées ou agglomérées et où, 50% ou plus des particules ont au moins une dimension externe dans la gamme de taille 1 nm - 100 nm." (2).

Les outils et les démarches analytiques proposées par Donovan et al. ainsi que par Barahona *et al*. sont révélateurs des efforts actuels pour lever les verrous méthodologiques et technologiques de la nanométrologie.

En effet les enjeux de la détection sont importants car les propriétés physico-chimiques de ces substances nanométriques peuvent être différentes de celles de leur état micrométrique et ce en cas d'exposition sur l'homme et de dissémination dans l'environnement. Bien que la première étude révèle que les traitements couramment utilisés pour l'eau potable présentent des taux d'abattement (efficacité d'élimination) élevés pour les trois types de NPs testées, elle met également en évidence la nécessité de comprendre les processus physico-chimiques à l'œuvre à chaque étape du procédé, afin de maîtriser le traitement d'une gamme de NPs la plus large possible. Dans la deuxième étude, Barahona *et al.* proposent quant à eux une approche méthodique qui met surtout en lumière la nécessité d'utiliser plusieurs techniques afin de révéler la présence de nanoparticules dans des matériaux aussi complexes que les aliments, les matrices environnementales ou encore biologiques. Cependant, il faut noter que la chaîne analytique proposée exige beaucoup de temps et un équipement analytique approprié. En conséquence, les investigations pour déterminer si un échantillon doit être classé comme "nanomatériau" ou pas, au regard de la définition de l'UE peuvent aujourd'hui difficilement être réalisées en routine.

GENERAL CONCLUSION

Developing our capacity to detect engineered nanoparticles in oral consumption products appears essential regarding the NPs estimated flows and their potential health impacts. In order to define a framework, the European Union (EU) proposed the following definition of the term "nanomaterial": "A natural, incidental or manufactured material containing particles, in an unbound state or as an aggregate or as an agglomerate and where, for 50 % or more of the particles in the number size distribution, one or more external dimensions is in the size range 1 nm - 100 nm." (2).

The analytical tools and approaches proposed by Donovan et al. and by Barahona et al. are significant of the intense ongoing work to lift the nanometrology technological and methodological locks. Indeed, the detection stakes are high because the physico-chemical properties of these nanometrical substances can be strongly different from the micrometrical ones, in case of human exposure and dissemination in the environment.

Although the first study reveals that common drinking water processes efficiently remove the three selected type of NPs, it also highlights the necessity to understand the physico-chemical processes at work for each step, in order to fully control the removal of a broad range of NPs type. In the second study, Barahona et al. propose a methodological approach which mainly put into relief the necessity to combine, in a define sequence, many different analytical techniques to be able to reveal NPs occurrence in materials as complex as food, environmental or biological matrices. However, it has to be emphasized that the above suggested analytical chain is highly demanding in terms of time, cost and analytical equipment. Thus investigations into whether a sample is a nanomaterial or not based on the current suggestion of the EU definition can currently hardly be performed on a routine basis.

Lexique

Adoucissement à la chaux : La chaux éteinte ($Ca(OH)_2$) est utilisée pour éliminer la dureté due aux carbonates contenus dans l'eau. L'adoucissement à la chaux peut aussi être utilisé pour éliminer l'arsenic dans l'eau.

Adsorption sur charbon actif : Les charbons actifs sont des produits carbonés traités qui présentent une structure graphite rudimentaire, extrêmement poreuse et une grande surface interne. L'adsorption sur charbon actif est un phénomène au cours duquel les molécules d'un liquide ou d'un gaz sont piégées à sa surface, externe ou interne.

Asymetrical Flow Field Flow Fractionation (A4F): Technique analytique de séparation des particules/agrégats de particules selon leur taille, basée sur l'utilisation d'un flux croisé et d'une membrane perméable.

Coagulation à l'alun : L'alun ou disulfate d'aluminium et de potassium, est un sel de formule chimique $KAl(SO_4)_2 \bullet 12\ H_2O$. Au contact de l'eau, il libère des hydroxydes d'aluminium, ce qui entraine la floculation puis la décantation des polluants.

Dynamic Light Scattering (Diffusion Dynamique de la Lumière, DLS). Technique d'analyse spectroscopique où une lumière laser diffuse dans toutes les directions lorsqu'elle rencontre une particule, donnant accès à sa taille.

Interactions de van der Waals, force de London : interactions électriques de faible intensité entre atomes ou molécules. La force de London est une composante des interactions de van der Waals, qui consite en une attraction entre deux dipôles induits (effets de dispersion).

Microscopie électronique en transmission (MET). Technique de microscopie basée sur la transmission d'un faisceau d'électrons au travers d'un échantillon très mince. Les interactions entre électrons et échantillons donnent naissance à une image dont la résolution peut atteindre 0.08 nm.

Multiangle light scattering (Diffusion Multiangle de la Lumière, MALS). Technique d'analyse similaire à la DLS, sauf que la lumière diffusée par la particule dans toutes les directions est détectée pour un ensemble discret d'angles par un/des détecteur(s).

Single particle ICPMS (comptage individuel de particule par ICPMS). Technique analytique permettant de mesurer la composition, la quantité et la distribution en taille des nanoparticules métalliques en suspension dans des matrices aqueuses. Il s'agit de mesurer par ICPMS le signal émis par une suspension de particules sur une durée de plusieurs secondes, en intégrant successivement le signal sur un pas de temps très court (0,1-1ms). Cela permet de distinguer le signal, continu, des éléments sous forme dissoute, de celui, ponctuel et élevé (pic), correspondant au nuage d'ions généré lors du passage d'une particule dans le plasma. Voir Bulletin de veille scientifique - Agents Physiques. 26:8-12, Anses - 2015.

Publications de référence

1 Lee J, Mahendra S, Alvarez PJJ. Nanomaterials in the Construction Industry: A Review of Their Applications and Environmental Health and Safety Considerations. *ACS Nano* 2010;**4**:3580-3590.

2 Commission E. Commission recommendation of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial (2011/696/EU). . *Official Journal of European Commission* 2011;**L 275**:38-40.

3 Lee S, Bi XY, Reed RB, Ranville et al. Nanoparticle Size Detection Limits by Single Particle ICP-MS for 40 Elements. *Environmental Science & Technology* 2014;**48**:10291-10300.

4 Roco MC. The long view of nanotechnology development: the National Nanotechnology Initiative at 10 years. *Journal of Nanoparticle Research* 2011;**13**:427-445.

5 Nowack B. The behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environmental Pollution* 2009;**157**:1063-1064.

6 Nowack B, Brouwer C, Geertsma RE et al. Analysis of the occupational, consumer and environmental exposure to

engineered nanomaterials used in 10 technology sectors. *Nanotoxicology* 2013;**7**:1152-1156.
7 Domingos RF, Baalousha MA, Ju-Nam Y et al. Characterizing Manufactured Nanoparticles in the Environment: Multimethod Determination of Particle Sizes. *Environmental Science & Technology* 2009;**43**:7277-7284.

Revues de la littérature

Laborda F, Bolea E, Cepriá G et al. Detection, characterization and quantification of inorganic engineered nanomaterials: A review of techniques and methodological approaches for the analysis of complex samples. Analytica Chimica Acta 2016;904:10-32.

Laborda F, Bolea E, Jiménez-Lamana J. Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry for the analysis of inorganic engineered nanoparticles in environmental samples. Trends in Environmental Analytical Chemistry 2016;9:15-23.

Majedi SM, Lee HK. Recent advances in the separation and quantification of metallic nanoparticles and ions in the environment. TrAC Trends in Analytical Chemistry 2016;75:183-196.

Rodrigues SM, Trindade T, Duarte AC, Pereira E, Koopmans GF, Römkens PFAM. A framework to measure the availability of engineered nanoparticles in soils: Trends in soil tests and analytical tools. TrAC Trends in Analytical Chemistry 2016;75:129-140.

Autres publications identifiées

Guo H, Xing B, Hamlet LC, Chica A, He L. Surface-enhanced Raman scattering detection of silver nanoparticles in environmental and biological samples. *Science of the Total Environment* 2016;554–555:246-252.
Etude qui développe la détection de nanoparticules d'argent dans des échantillons environnementaux et biologiques en spectroscopie par effet de surface (SERS).

Guo H, Xing B, He L. Development of a filter-based method for detecting silver nanoparticles and their heteroaggregation in aqueous environments by surface-enhanced. *Raman spectroscopy. Environmental* Pollution 2016;211:198-205.
Etude de l'hétéroagrégation de nanoparticules d'argent/sels de $CaCl_2$ ou $AlCl_3$ en solutions aqueuses naturelles par SERS.

Ramos K, Gómez-Gómez MM, Cámara C, Ramos L. Silver speciation and characterization of nanoparticles released from plastic food containers by single particle ICPMS. *Talanta* 2016;151:83-90.
Les nanoparticules d'argent issues de plastiques utilisés comme contenant alimentaire (biberons...) sont détectées par SEM-EDX puis mesurées et comptées par spICPMS.

Mandyla SP, Tsogas GZ, Vlessidis AG, Giokas DL. Determination of gold nanoparticles in environmental water samples by second-order optical scattering using dithiotreitol-functionalized CdS quantum dots after cloud point extraction. Journal of Hazardous Materials.

Cette étude développe la méthode du "cloud point extraction" pour la détection de nanoparticules d'or dans des eaux de rivière naturelles.

Liens d'intérêts :

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

Toxicité de la cellulose nanométrique : des incertitudes persistent

Ludwig VINCHES et Stéphane HALLE | **ludwig.vinches@gmail.com**

École de technologie supérieure - Département de génie mécanique – Montréal - Canada

Mots clés : **Cytotoxicité, modification chimique, nanocellulose, nanocristaux, nanofibres, protocole de synthèse, toxicité**

La nanocellulose est un biopolymère disponible en abondance. En effet, elle est synthétisée à partir de la cellulose contenue dans certains végétaux comme la pulpe des arbres, le coton ou encore le bambou. Elle se compose principalement de 10 à 100 unités répétitives de glucose ayant chacune six groupes hydroxyles (1). Conséquence directe de leurs propriétés physico-chimiques et mécaniques particulières, la nanocellulose cristalline (NCC) et les nanofibres ou nanofibrilles de cellulose (NFC) sont introduites dans la fabrication d'une multitude de produits de consommation courante tels que les produits agroalimentaires (nourriture (2) et emballage des produits (1,3)). Depuis quelques années, des études mettent en avant leurs propriétés antifongiques (4) et antimicrobiennes (5) mais c'est surtout dans le domaine de la santé que les propriétés de la nanocellulose sont exploitées (6,7).
Alors qu'elles étaient sans danger pour la santé et l'environnement (8,9), du fait de leur origine naturelle, des études récentes soulignent cependant un faible risque toxicologique de la NCC et des NFC. Cette veille scientifique rapporte les dernières connaissances sur la toxicité de ces deux formes de nanocellulose. Le premier article présente de récents travaux sur la cytotoxicité des NFC sur des cellules de la peau humaine (fibroblastes et kératinocytes). Il présente aussi un nouveau protocole de synthèse pour obtenir des NFC de grade ultrapur afin de limiter le niveau d'endotoxines. La deuxième publication montre très clairement les limites actuelles recontrées lors de l'étude de la toxicité de la nanocellulose. En effet, certains paramètres importants ne sont pas encore pris en considération comme la synthèse et l'agglomération de la cellulose nanométrique.
Ces deux publications s'accordent sur une faible toxicité de la NCC et des NFC produites intentionnellement. Mettant en avant des protocoles expérimentaux rigoureux et des méthodes de synthèse novatrices, elles ne concluent pas sur une totale innocuité de la nanocellulose étant donné que les impacts de nombreux facteurs ne sont pas encore connus.

Produire des nanofibrilles ultrapures et évaluer leur cytotoxicité sur des cellules de peau humaine

Nordli HR. et al. (2016). Producing Ultrapure Nanofibrils and Evaluating the Cytotoxicity Using Human Skin Cells. Carbohydrate Polymers, vol. 150 :p65-73

Résumé

Dans cet article, les auteurs font ressortir deux problématiques importantes. La première est la fabrication de nanofibrilles de cellulose (NFC) ultrapures (< 100 unités d'endotoxine/gramme) permettant de limiter des réponses inflammatoires non désirées et la deuxième est l'évaluation de la toxicité de ces nanofibrilles.

Pour répondre à la première problématique, les auteurs ont développé un protocole de synthèse rigoureux qui leur a permis d'atteindre des taux d'endotoxine de 45 unités par gramme de NFC et allant jusqu'à 2,1 unités par gramme pour la NFC en aérogel.

Après la caractérisation des NFC (microscopie électronique et capacité de rétention d'eau), les NFC ultrapures produites ont été utilisées pour les tests de toxicité. Ces tests ont été menés sur deux types de cellules de la peau humaine (les fibroblastes et les kératinocytes) qui jouent un rôle très important dans le processus de cicatrisation. Après différentes périodes d'incubation (6 et 24 heures), il apparait une diminution de l'activité métabolique des fibroblastes et une absence de mortalité cellulaire. Pour les kératinocytes, une diminution significative de l'activité métabolique est observée après une incubation de deux heures. À l'instar des fibroblastes, aucune mortalité cellulaire n'apparait. Les auteurs ont aussi comparé (par microscopie électronique) la morphologie des cultures de cellules après 24 heures d'incubation avec ou sans NFC. Les différences de morphologie sont significatives. Enfin, ils ont évalué la réponse immunologique. Les réponses varient entre celles obtenues sur fibroblastes ou kératinocytes, et des 27 cytokines mesurées, aucune augmentation n'est observée.

Commentaire

Afin de minimiser les faux positifs et les résultats erronés, il est important de mener les tests de toxicité avec des nano-objets ultrapurs. Les auteurs ont su développer un protocole de synthèse des NFC innovant et performant. C'est une avancée considérable pour les futures équipes qui travailleront sur la toxicité des NFC. Bien que ce ne soit pas l'objet de cet article, il serait intéressant de valider cette méthode de synthèse, ou du moins s'en inspirer pour obtenir de la nanocellulose cristalline de grade ultrapure.

Les auteurs ont mené leurs essais de toxicité sur des cellules de peau humaine. L'objectif final est de vérifier la non-toxicité des NFC afin de les inclure dans la formulation de pansements. En effet, les NFC ont une capacité de rétention d'eau très importante ce qui est une propriété indispensable dans la conception des pansements. Ces derniers étant aussi souvent en contact avec des cellules sanguines, quelques résultats avec ce type de cellule auraient pu possiblement conforter les conclusions des auteurs quant à l'intégration des NFC dans les pansements. Néanmoins, cette étude pose

des bases très intéressantes pour la synthèse de la nanocellulose ultrapure.

Impacts de la modification chimique sur la toxicité de différents matériaux de nanocellulose sur le développement du poisson-zèbre

Harper BJ. et al. (2016). Impacts of chemical modification on the toxicity of diverse nanocellulose materials to developing zebrafish. Cellulose, vol. 23:p1763

Résumé

Les auteurs de cet article ont étudié la toxicité de nanocristaux de cellulose (NCC) et de nanofibres de cellulose (NFC) sur des embryons de poisson-zèbre. Deux paramètres principaux ont été étudiés : la méthode de synthèse des NFC (chimique ou mécanique) et différentes fonctionnalisations des NCC (modifications chimiques) conduisant à des surfaces de charges différentes (anioniques, cationiques ou neutres). Les auteurs ont caractérisé par microscopie électronique les dimensions moyennes des NCC (120 x 9) nm et déterminé le potentiel zêta des NCC.

Les essais de toxicité ont été réalisés à des concentrations d'exposition de 0,2 à 200 mg/L pour les NCC et de 2 à 250 mg/L pour les NFC, pendant une durée d'incubation de 5 jours à 26,8°C.

Dans leurs premiers résultats, les auteurs montrent que les modifications de surface (carboxylée, sulfatée, etc.) des NCC ont une très faible incidence sur leur potentiel toxique vis-à-vis des embryons et de leur développement. Par ailleurs, il semblerait que la provenance des NCC (pâte de bois ou coton) n'a qu'un très léger impact sur la toxicité.

En ce qui concerne les NFC, leur toxicité sur les embryons de poissons-zèbre est également faible. A 250 mg/L, l'un des deux types de NFC fabriquées par homogénéisation mécanique, laisse apparaitre une toxicité plus élevée que des NCC synthétisées par voie chimique, suggérant que la méthode d'obtention des NFC peut parfois mais pas systématiquement conduire à un effet toxique plus important.

Dans leurs derniers essais, les auteurs ont mesuré par fluorescence, l'absorption de NCC par les poissons-zèbre. Les résultats montrent que l'absorption de NCC par les embryons débute après trois jours d'exposition et augmente significativement après quatre et cinq jours, suggérant que les NCC fluorescents sont absorbés par voie cutanée puis par voie orale lors des stades ultérieurs de leur développement.

Commentaire

Cette étude visait à évaluer le caractère toxique de différents nanocristaux et nanofibres de cellulose sur le développement embryonnaire du poisson-zèbre. Les résultats montrent une faible toxicité des NCC et NFC testés et suggèrent que le facteur de forme élevé de ces nanomatériaux n'est pas un élément prédominant pour prédire leur toxicité. Les auteurs ont également montré que différentes modifications de surface des NCC et NFC, en termes de charges, avaient très peu d'incidence sur le développement et la mortalité des embryons. Pour les NFC, il a été montré que la méthode de synthèse utilisée (chimique ou mécanique) pouvait avoir une incidence sur la toxicité vis à vis des embryons, sans pour autant que cela soit systématique.

Tout d'abord, il faut noter une très bonne description des différents procédés de synthèse des NCC et des protocoles de modifications chimiques de surface. Afin d'avoir des résultats statistiques en ce qui concerne la caractérisation des NCC par microscopie électronique, un nombre de particules analysées plus important est souhaitable.

Bien que l'étude n'ait pas été menée sur les cellules humaines, les auteurs concluent sur une faible toxicité NCC et NFC. De plus, les résultats sont très intéressants surtout du point de vue de l'absence d'impact des modifications chimiques de surface des NCC sur leur toxicité.

Comme l'indiquent les auteurs, l'agglomération des NCC peut considérablement affecter leurs propriétés toxiques. Les auteurs en ont conscience et une étude plus ciblée sur cette problématique serait très intéressante à envisager.

Conclusion générale

Ces deux articles mettent l'accent sur la toxicité de la NCC et des NFC qui sont principalement utilisées en laboratoire de recherche et produites industriellement au Canada depuis 2012 (1 t/jour).

Au vu de ces deux publications, il apparait que la toxicité de la NCC et des NFC est faible mais pas totalement nulle. Les essais menés ici sont réalisés soit sur des embryons de poisson, soit sur des cellules de peau humaine et dans les deux situations, l'exposition est par contact sous forme liquide. Cependant, la nanocellulose se retrouve souvent en milieu de travail sous forme aéroportée (en suspension dans l'air), lors de leur manipulation, ce qui complique considérablement leur confinement par rapport à des formes colloïdales liquides.

Comme le souligne le second article, des facteurs comme l'agglomération peuvent jouer un rôle prépondérant dans les mécanismes conduisant à une augmentation ou une diminution de la toxicité des NCC et NFC.

Il apparait urgent d'améliorer nos connaissances sur la toxicité de la nanocellulose en prenant en compte des paramètres non étudiés jusqu'à présent et surtout de limiter son utilisation grandissante sans connaitre encore parfaitement le potentiel toxique de ces nano-objets. En milieu de travail, des mesures de prévention doivent être mis en place, comme cela est fait pour d'autres nanoparticules, afin de limiter les risques d'exposition des travailleurs manipulant de la nanocellulose.

GENERAL CONCLUSION

These articles emphasize the toxicity and cytotoxicity of the NCC and NFC, which are mainly used in research laboratory. But since 2012 they are commercially produced in Canada (production of 1 ton per day).

In light of these two publications, it appears that the toxicity of the NCC and the NFC is weak but not totally zero. Although the exposure tests were conducted on fish embryos or cells from human skin (in liquid medium), we often find airborne nanocellulose (in suspension in the air) in workplace which considerably complicates their confinement in relation to forms colloidal liquids.

As highlighted in the second article, factors such as the source and nanocellulose synthesis process may significantly alter its toxic nature. Further parameters such as agglomeration can play a key role in the mechanisms leading to an increase or possibly a decrease the toxicity of the NCC and NFC.

It appears urgent to improve our knowledge about the toxicity of nanocellulose taking into account non-studied parameters and especially to minimize excessive use without knowing yet the toxic potential of these nano-objects. In workplace, the precautionary principle, as for many other nanoparticles, should be put in place to limit the risk of exposure of workers handling nanocellulose.

Lexique

Fibroblaste : cellule du tissu conjonctif assurant principalement la souplesse et la cohérence du derme
Groupe hydroxyle : fonction chimique comportant un atome d'oxygène et un atome d'hydrogène (-OH)
Kératinocyte : cellule composant 90% de la couche superficielle de la peau
Potentiel zêta : il caractérise la charge électrique (provenant des ions qui l'entourent) d'une particule lorsque celle-ci est en solution. Il permet ainsi de rendre compte de la stabilité d'une solution de particules.

Publications de référence

1 Dhar P, Bhardwaj U, Kumar A, et al. Cellulose Nanocrystals: A Potential Nanofiller for Food Packaging Applications. *Food additives and packaging* 2014;**1162** :197-239.

2 Gomez H, Serpa A, Velasquez-Cock J, et al. Vegetable nanocellulose in food science: A review. *Food Hydrocolloids* 2016;**57**:178-186.

3 El-Wakil NA, Hassan EA, Abou-Zeid RE, et al. Development of wheat gluten/nanocellulose/titanium dioxidenanocomposites for active food packaging. *Carbohydrate Polymers* 2015;**124** :337-346.

4 Robles E, Salaberria AM, Herrera R, et al. Self-bonded composite films based on cellulose nanofibers and chitin nanocrystals as antifungal materials. *Carbohydrate Polymers* 2016;**144** :41-49.

5 Tang J, Song Y, Tanvir S, et al. Polyrhodanine Coated Cellulose Nanocrystals: A Sustainable Antimicrobial Agent. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 2015;**3** :1801-1809.

6 Lin N et Dufresne A. Nanocellulose in biomedicine: Current status and future prospect. *European Polymer Journal* 2014;**59** :302-325.

7 Sunasee R, Hemraz UD et Ckless K. Cellulose nanocrystals: A versatile nanoplatform for emerging biomedical applications. *Expert Opinion on Drug Delivery* 2016;

8 Kovacs T, Naish V, O'Connor B et al. An ecotoxicological characterization of nanocrystalline cellulose (NCC). *Nanotoxycology* 2010;**4**(3) :255-270.

9 Shatkin JA et Mram K. Cellulose nanomaterials: life cycle risk assessment, and environmental health and safety roadmap. *Environmental Science Nano* 2015;**2**:477-499.

10 Harper B, Sinche F, Ho Wu R et al. The impact of the surface ligands and synthesis method on the toxicity of glutathione-coated gold nanoparticles. *Nanomaterials* 2014;**4**:355-371.

Revues de la littérature

Jebali A, Ardakani AY, Sedighi N, et al. Cytocompatibility and immunomodulatory properties of wood based nanofibrillated cellulose. *Cellulose* 2015;**22** (1):763-778.

Mertaniemi H, Escobedo-Lucea C, Sanz-Garcia A, et al. Human stem cell decorated nanocellulose threads for biomedical applications. *Biomaterials* 2016;**82**:208-220.

Roman M. Toxicity of Cellulose Nanocrystals: A Review. *Industrial Biotechnology* 2015;**11** (1):25-33.

Du L, Arnholt K, Ripp S, et al. Biological toxicity of cellulose nanocrystals (CNCs) against the luxCDABE-based bioluminescent bioreporter Escherichia coli 652T7. *Ecotoxicology* 2015;**24**(10):2049-2053.

Liens d'intérêts :

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

anses
agence nationale de sécurité sanitaire
alimentation, environnement, travail

Connaître, évaluer, protéger

Bulletin de veille scientifique

Édition scientifique • Bulletin de veille n° 31 • Mars 2017
Notes d'actualité scientifique

Agents chimiques

Présence de perturbateurs endocriniens, au niveau placentaire et dans des produits à usage cosmétique

Patrick THONNEAU | **thonneaupatrick@yahoo.fr**

Inserm - EA 3694 - Toulouse

Mots clés : **Benzophénone 3, exposition gravidique, parabènes, perturbateurs endocriniens, phtalates, produits cosmétiques, triclosan**

Plusieurs publications récentes ont mis en évidence la possible contamination par des produits chimiques de type « perturbateurs endocriniens », via l'usage de produits cosmétiques et de soins cutanés dans la population féminine, et plus particulièrement chez les adolescentes (1, 2). Parmi les produits chimiques les plus utilisés dans les cosmétiques (parfums, déodorants, savons, shampoings, vernis pour ongles, crèmes solaires, crèmes à lèvres), se trouvent des phtalates (diethylphtalate, DEP ; di-n-butylphtalate, DnBP ; di-isobutylphtalate, DiBP)*, des parabènes*, et certains phénols (oxybenzone*, triclosan*). Il faut rappeler que la plupart des phtalates sont interdits en Europe (cf. références juridiques en annexe).
L'étude NHANES (National Health and Nutrition Examination Survey) publiée en 2014 a montré que 96% des participants à cette enquête présentaient des métabolites du DEP, DnBP et DiBP dans leurs urines (3). Depuis, de nombreux laboratoires fabricants de produits cosmétiques ont modifié leurs pratiques en réduisant l'utilisation de tels produits et aussi en mentionnant sur leurs étiquettes les termes « phthalates - parabens free », en visant les populations féminines et plus particulièrement les adolescentes. La première étude présentée ici vise à évaluer si des modifications dans l'utilisation de produits cosmétiques « phtalates - parabens free » par les adolescentes, se traduisent rapidement dans les valeurs urinaires de ces produits chimiques (phtalates parabènes, phénols).
Toujours dans le domaine des cosmétiques, les produits dits de « soins personnels » doivent assurer des propriétés à la fois protectrices vis-à-vis des rayons ultra-violets et aussi vis-àvis de possibles contaminations microbiennes intrinséques (c'est à-dire liées au seul produit cosmétique et non pas en lien avec son utilisation), tout en gardant leur stabilité et leurs fonctions spécifiques, et ceci sans oublier leur fragrance (4).Schématiquement, les parabènes contenus dans les produits cosmétiques sont utilisés comme des agents de préservation microbienne du produit. Les benzophénones sont, quant-à eux, utlisés comme des filtres anti-UV (présents dans la plupart des enrobages). Ils ont également un rôle de protection de la formulation contre la dégradation des substances sensibles à la lumière mais à des concentrations plus faibles. La seconde étude présentée dans cette note vise à évaluer si des expositions à ces deux familles chimiques peuvent survenir avant même la naissance via des contaminations placentaires, comme cela a été suspecté par de récentes études (5, 6).

Réduction de l'exposition aux phtalates, parabènes et phénols dans une population d'adolescentes via une modification d'usage de certains produits cosmétiques

Harley KG. et al. **(**2016). Reducing Phthalate, Paraben, and Phenol Exposure from Personal Care Products in Adolescent Girls: Findings from the HERMOSA Intervention Study. Environ Health Perspect. Vol. 124: p.1600–1607

Résumé

Dans le cadre du programme HERMOSA (Health and Environmental Research on Make-up of Salinas Adolescents - Californie), 100 adolescentes latino-américaines ont été recrutées sur une base de volontariat et ont accepté de changer leurs habitudes personnelles, en utilisant pendant une période de trois jours uniquement des produits cosmétiques fournis par l'équipe de recherche, et exempts de phtalates, parabènes, triclosan ou benzophénone-3. Un dosage urinaire, avant et après les 3 journées, a été effectué pour chaque participante, par spectrométrie de masse associée à une chromatographie liquide.Les concentrations urinaires montrent une baisse de 27.4% de la teneur en mono-éthyle phtalates (MEP), de 43.9% pour le méthyl parabène et de 45.4% pour le propyl parabène, de 35.7% pour le triclosan et de 36.0% pour le benzophénone-3. Aucune baisse significative n'a été enregistrée pour le mono-n-butylphtalate (MnBP) et le mono-isobutylphtalate (MiBP).

Commentaire

Cette étude met en évidence le rôle possible des consommatrices pour un choix volontaire de produits cosmétiques exempts de phtalates, parabènes, triclosan ou de benzophénone-3, permettant ainsi une réduction notable de l'exposition à ces substances, considérées comme des perturbateurs endocriniens potentiels. A travers ces résultats, les auteurs mettent en avant l'importance de l'éducation et de la responsabilité des usagers et usagères, et tout particulièrement des populations féminines les plus jeunes, vis-à-vis de l'usage de produits cosmétiques pouvant générer des expositions potentiellement délétères à des perturbateurs endocriniens.

Une limite de cette étude est de ne pas avoir effectué de dosages des phtalates, parabènes, triclosan ou de benzophénone-3 dans les cosmétiques utilisés régulièrement par les participantes, avant le début de l'enquête, et dans les produits cosmétiques dits de remplacements. Les résultats étant uniquement appréciés via les teneurs urinaires. Par ailleurs, le fait de continuer à retrouver, après les trois jours d'essais, des concentrations urinaires détectables en phtalates, parabènes, triclosan et benzophénone-3, montre que la rémanence de certains de ces composés est supérieure à trois jours.Toutefois, la cinétique d'élimination rapide des parabènes plaide plutôt pour une exposition d'origine alimentaire.

Une autre hypothèse, plus plausible, serait que les cosmétiques de remplacement ne sont pas totalement exempts de ces mêmes composés, et qu'il existe probablement d'autres sources d'exposition aux phtalates, parabènes, triclosan et benzophénone-3, que celle liée aux cosmétiques. Enfin il convient de noter que certaines habitudes communautaires aux Etats-Unis consistant à utiliser des produits d'importation à visée esthétique peuvent générer des expositions pouvant être méconnues (comme par exemple les produits de lissage brésilien qui contiennent du formaldéhyde, interdit en Europe et aux USA, mais sans que leur présence soit indiquée sur l'étiquetage).

En conclusion, les contaminations à des perturbateurs endocriniens via l'utilisation de produits cosmétiques est certes une hypothèse à considérer mais la multiplicité des sources possibles d'expositions à ces produits et les cinétiques particulières des produits amènent à considérer avec prudence cette hypothèse.

Mesure de la teneur en parabène et en benzophénone (filtre anti UV) au niveau placentaire humain. Première description de la présence du benzylparaben et de la benzophénone-4

Valle-Sistac J. et al. (2016). Determination of parabens and benzophenone-type UV filters in human placenta. First description of the existence of benzylparaben and benzophenone-4. Environ Int, vol. 88: p. 43-9.

Résumé

Afin d'évaluer l'exposition intra-utérine aux parabènes et à la benzophénone, des fragments de duze placentas de femmes (Hôpital Saint Jean de Dieu, Barcelone) ont été collectés à la naissance et analysés par chromatographie liquide et spectrométrie masse-masse (7) (fragments placentaires collectés, rincés dans une solution saline et congelés à -80° C). Les molécules suivantes : Benzophénone-1, éthyle parabène, butyle parabène et benzyle parabène ont été retrouvées dans tous les échantillons, avec la concentration la plus élevée pour le méthyle parabène (11,77 ng/g de poids).

Si les parabènes ont tous été détectés avec des concentrations souvent élevées, les produits anti UV de type benzophénone ont, quant à eux, été détectés à de faibles concentrations ; le benzophénone-3 n'a jamais été mis en évidence et son principal métabolite, le benzophénone-1, a été mis en évidence dans tous les échantillons en dessous des limites de quantification.

Pour les auteurs, la présence de ces deux familles de produits apportent la preuve de leur bioaccumulation au niveau placentaire et d'une possible exposition de l'embryon aux parabènes et à la benzophénone-1.

Commentaire

Cette étude montre une possible bioaccumulation de ces deux familles de produits, parabènes et benzophénone, au niveau placentaire (la présence de parabènes et de benzophénone avait déjà été démontrée au niveau urinaire, dans le lait et dans les tissus humains). Ces résultats soulèvent l'hypothèse d'une possible exposition très précoce à ce type de produits lors de la vie intra-utérine, et d'éventuelles conséquences sur l'embryon et sur son développement ultérieur.

Toutefois plusieurs facteurs limitant amènent à relativiser les résultats concernant leur bioaccumulation, en particulier les demi-vies courtes de ces produits et surtout les possibles contaminations régulières via d'autres sources, en particulier alimentaires.

Une contrainte technique de cette étude tient aussi aux difficultés de dosage (quantification par un procédé novateur et n'ayant pas été publié auparavant) de ces deux produits dans le milieu assez particulier que constitue le placenta ; une confirmation des méthodes de dosage utilisées pour ce type de compartiment est attendue. Enfin, le faible nombre de placentas analysés (n=13) nécessite une confirmation de ces résultats sur une plus grande échelle, avec la mesure des autres sources de contamination et l'accumulation de ces produits.

Conclusion générale

De nombreuses études récentes ont mis l'accent sur la présence de composants de type « perturbateurs endocriniens » dans les produits cosmétiques et de soins du corps, avec des conséquences néfastes éventuelles.

Ces deux études montrent d'une part qu'une sensibilisation et éducation sanitaire des usagères, et en particulier des adolescentes, pour une utilisation de cosmétiques contenant peu ou pas, certains types de composés chimiques (phtalates, parabènes, triclosan, benzophénones) a un impact et qu'elle permet de réduire les expositions à ces composés chimiques.D'autre part, l'utilisation et la diffusion de plus en plus importante de ces mêmes composés chimiques est attesté par leur présence dans l'ensemble des compartiments du corps humain et aussi au niveau du placenta.

La multiplication des risques d'exposition à ces composés chimiques, phtalates, parabènes, triclosan, phénols, doit amener à mieux comprendre leur dangerosité et aussi à promouvoir des attitudes d'éviction et de prévention vis-à-vis de ces expositions.

GENERAL CONCLUSION

Numerous and recent international studies gave emphasis in the increasing presence of chemical products having endocrine disruptors in cosmetic products, leading topotential deleterious disorders.

The first study shows that avoiding body creams and lotions containing phthalates, paraben, triclosan, phenols, during a short period of time (3 days), could thus reduce significantly exposure to these components. Health education for use cosmetics with 'paraben and phthalates free', especially for young pregnant girls and also for the whole female population, could be an interesting alternative to reduce exposure to these chemical products.

The second study shows that paraben and benzophenone were identified in placenta as in other compartments of human tissues, demonstrating the widespread occurrence of exposures to such type of chemical products.

Lexique

Benzophénone : molécule cétonique utilisée dans les encres et les vernis UV d'imprimerie, comme intermédiaire pour la synthèse de composés pharmaceutiques et agrochimiques et dans l'industrie des parfums (les benzophénones 3, 4, 5 sont réglementées par le règlement cosmétique (CE) n°1223/2009). Ce composé est également utilisé comme additif dans les cigarettes.

Parabène : conservateur (antimicrobien et antifongique) essentiellement utilisé dans les cosmétiques et, de façon plus marginale, dans les médicaments et certains aliments comme additifs alimentaires (identifiés par E214 jusqu'à E219). Les parabènes les plus utilisés sont : le propylparabène (E216 et E217) et butylparabène ainsi que le méthylparabène (E218 et E219) et l'éthylparabène (E214 et E215). Les parabènes notamment le méthyle parabène, existent à l'état naturel à de faibles concentrations dans les aliments (mûres, orge, fraise, cassis, vanille, carotte ou oignon). Les produits cosmétiques pouvant contenir des parabènes sont les autobronzants, déodorants, produits d'hygiène buccodentaire, produits capillaires, produits de soin pour bébé, maquillage, soins pour la peau, produits de rasage et épilatoire, vernis à ongles, gels hydro alcooliques (qui sont des produits biocides). Les parabènes sont réglementés par le règlement cosmétique (CE) N°1223/2009.

Les parabènes présents dans les médicaments servent à éviter leur dégradation en les préservant de contamination bactérienne.

Phtalates : composés chimiques ubiquitaires et essentiellement utilisés comme plastifiants.

Triclosan : le triclosan ou 5-chloro-2-(2,4-dichlorophénoxy) phénol est un biocide. Il est utilisé depuis les années 1970, dans des centaines de produits courants (dont produits de soins courants) depuis le début des années 1990. Il possède des propriétés biocides (antifongique et antibactérien à large spectre). Le triclosan est réglementé par le règlement cosmétique (CE) n°1223/2009.

Publications de référence:

1 Braun JM,Just AC, Williams PL,Smith KW,Calafat AM,Hauser R. Personal care product use and urinary phthalate metabolite and paraben concentrations during pregnancy among women from a fertility clinic. *J Expo Sci Environ Epidemiol. 2014 Sep-Oct;24(5):459-66.*

2 Meeker JD,CantonwineDE, Rivera-González LO, Ferguson KK, Mukherjee B, Calafat AM, Ye X, Anzalota Del Toro LV, Crespo-Hernández N, Jiménez-Vélez B, Alshawabkeh AN, Cordero JF. Distribution, variability, and predictors of urinary concentrations of phenols and parabens among pregnant women in Puerto Rico.*Environ SciTechnol*. 2013 Apr 2;47(7):3439-47.

3 Zota AR, Calafat AM, Woodruff TJ. Temporal trends in phthalate exposures: findings from the National Health and Nutrition Examination Survey, 2001-2010.*Environ Health Perspect*. 2014Mar;122(3):235-41.

4 Pycke BF, Geer LA, Dalloul M, Abulafia O, Jenck AM, Halden RU. Human fetal exposure to triclosan and triclocarban in an urban population from Brooklyn, New York.*Environ Sci Technol*.2014;48(15):8831-8

5 Zhang T, Sun H, Qin X, Wu Q, Zhang Y, Ma J, Kannan K. Benzophenone-type UV filters in urine and blood from children, adults, and pregnant women in China: partitioning between blood and urine as well as maternal and fetal cord blood. *Sci Total Environ*.2013Sep 1;461-462:49-55

6 Alonso MB, Feo ML, Corcellas C, Gago-Ferrero P, Bertozzi CP, Marigo J, Flach L, Meirelles AC, Carvalho VL, Azevedo AF, Torres JP, Lailson-Brito J, Malm O, Diaz-Cruz MS, Eljarrat E, Barceló D. Toxic heritage: Maternal transfer of pyrethroid insecticides and sunscreen agents in dolphins from Brazil.*Environ Pollut*.2015 Dec;207:391-402.

7 Gago-Ferrero P, Mastroianni N, Díaz-Cruz MS, Barceló D. Fully automated determination of nine ultraviolet filters and transformation products in natural waters and wastewaters by on-line solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2013 Jun 14;1294:106-16.

Références réglementaires

* Avis du SCCP, Opinion on Phtalates in CosmeticProducts, du 21 Mars 2007.

* Directive Cosmétique 76/768/CE relative aux produits cosmétiques.

* Directive 67/548/CE relative à la classification, l'emballage et l'étiquetage des substances dangereuses.

* Règlement 1272/2008/CE relative à la classification, l'emballage et l'étiquetage des substances dangereuses et abrogeant la Directive 67/548/CE.

Liens d'intérêts :

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

Etude de l'exposition aux mélanges binaires de perturbateurs endocriniens

Radhouane CHAKROUN | r_chakroun@yahoo.fr

Institut de santé et de sécurité au travail - Laboratoire de toxicologie professionnelle - Tunis - Tunisie

Mots clés : **Bisphénol A, butylparabène, diéthylstilbestrol, effets, exposition simultanée, gallate de propyle, hydroxyanisole butylé, hydroxytoluène butylé, mélanges, perturbateurs endocriniens**

Les perturbateurs endocriniens (PE*) peuvent être présents, de manière naturelle ou du fait d'une contamination, dans différents milieux (air, eaux, aliments, produits ou articles de consommation…). Les effets de ces PE suscitent une grande inquiétude pour la santé publique, notamment par rapport aux effets sur la fonction de reproduction masculine. De nombreuses études se sont penchées sur les effets individuels de ces substances. Cependant, dans les conditions réelles de la vie, l'Homme est exposé simultanément à de nombreux PE. L'étude de l'exposition simultanée à plusieurs PE est d'une importance cruciale pour une meilleure évaluation des risques sanitaires potentiels.

La première étude sélectionnée pour cette note concerne les effets de l'exposition simultanée au bisphénol A (BPA) et au diéthylstilbestrol (DES*) sur le système reproducteur mâle des rats. Le BPA est très utilisé dans la fabrication de plastiques polycarbonates, alors que le DES est un estrogen de synthèse qui a été prescrit dans le passé aux femmes enceintes se plaignant de fausses couches répétitives et qui a été aussi utilisé en alimentation animale. Dans la deuxième étude, des cellules cancéreuses humaines ont été utilisées pour évaluer les effets anti-androgéniques individuels et des mélanges binaires de quatre PE très utilisés dans les industries agro-alimentaires et cosmétiques.

Effets de l'exposition simultanée par voie orale à de faibles doses de bisphénol A et de diéthylstilbestrol sur le système reproducteur mâle de rats Sprague-Dawley

Jiang X. et al. (2016). Low-dose and combined effects of oral exposure to bisphenol A and diethylstilbestrol on the male reproductive system in adult Sprague-Dawley rats. Environ Toxicol Pharmacol, vol. 43: p. 94-102.

Résumé

Cette étude avait pour objectif d'étudier les effets de l'exposition simultanée à faibles doses de bisphénol A (BPA) et de diéthylstilbestrol (DES) sur le système reproducteur mâle des rats Sprague-Dawley. Des groupes de huit rats ont ainsi été exposés pendant huit semaines par voie orale (gavage) au BPA et au DES dissous dans de l'huile de maïs respectivement à des doses de 0,5 ou 5 mg/Kg/j et 0,05 ou 0,5 µg/Kg/j, ou au mélange des deux composés (0,5 mg/kg/j BPA + 0,05 µg/kg/j DES ou 5 mg/kg/j BPA + 0,5 µg/kg/j DES). Le groupe témoin a reçu uniquement de l'huile de maïs. Les résultats mettent en évidence une baisse de la mobilité des spermatozoïdes pour tous les groupes exposés. Alors que le DES seul n'a pas d'effet, le BPA aux deux doses testées induit une augmentation d'anomalies morphologiques des spermatozoïdes et la co-exposition entraine un effet synergique. Les lésions histologiques étaient également plus significatives chez les groupes co-exposés par rapport aux groupes mono-exposés. Les auteurs rapportent une diminution significative des concentrations sériques moyennes de testostérone et de l'hormone lutéotrope chez certains groupes mono ou co-exposés au mélange (BPA 5 mg/Kg/j + DES 0,5 µg/Kg/j) par rapport au groupe témoin. Les concentrations sériques moyennes d'œstradiol ont au contraire enregistré une augmentation significative chez les rats exposés au DES (0,05 µg/Kg/j) et au mélange (BPA 5 mg/Kg/j + DES 0,5 µg/Kg/j). Néanmoins, l'exposition simultanée au BPA et au DES n'a pas eu d'effet sur les concentrations sériques de ces hormones par rapport aux groupes mono-exposés. Aucun effet lié à la co-exposition, ni dose-dépendant, ni additif ou synergique n'a été observé. Des lésions au niveau des tubes séminifères ont été observées, ainsi qu'au niveau de l'ultrastructure des cellules de Sertoli et des cellules de Leydig, en particulier au niveau du réticulum endoplasmique (RE*) pour tous les groupes traités. L'étude du mécanisme d'action au niveau du réticulum endoplasmique a mis en évidence une augmentation significative du facteur de transcription CHOP, marqueur de stress du RE chez les groupes exposés aux deux composés, seuls ou en mélange.

Commentaire

Les effets de l'exposition individuelle au BPA et au DES ont été largement étudiés. Ces études ont mis en évidence l'effet perturbateur endocrinien (PE) des deux composés. Or, il est connu que la relation dose-effet pour les PE n'est pas de type classique et peut varier de manière importante selon les niveaux d'exposition (courbes dose-effet en forme de « U » ou « U » inversée) (1). De plus, les effets dus à l'exposition concomitante aux deux substances et plus particulièrement aux faibles doses demeurent encore mal connus. Cette étude présente l'avantage d'avoir non seulement confirmé les effets reprotoxiques des deux composés aux faibles doses, mais elle a également mis en évidence d'une part, une implication du RE dans le mécanisme d'action et surtout, un effet toxique significativement plus élevé sur l'appareil reproductif mâle des rats exposés aux mélanges de BPA et DES par rapport aux groupes de rats mono-exposés. Néanmoins, il est difficile d'extrapoler à l'Homme les effets observés. En effet,

une étude réalisée sur des testicules de fœtus humains et de rongeurs en culture a montré que les cellules humaines sont plus sensibles au BPA que les cellules de rats de souche Wistar et de souris alors que le DES affecte la sécrétion de testostérone dans les cultures de testicules de rats et de souris, mais pas dans celles de testicules fœtaux humains (2). En outre, le mécanisme d'interaction entre les deux composés mériterait de plus amples investigations.

Etude *in vitro* des effets anti-androgéniques individuels et combinés de certains additifs alimentaires et agents conservateurs utilisés dans les produits cosmétiques

Pop A. et al. (2016). Individual and combined *in vitro* (anti)-androgenic effects of certain food additives and cosmetic preservatives. Toxicol In Vitro, vol. 32: p. 269-77.

Résumé

De nombreux produits cosmétiques ou alimentaires peuvent contenir des substances pouvant jouer le rôle de perturbateurs endocriniens. Le but de cette étude était d'évaluer les effets individuels et des mélanges binaires du butylparabène (BuPB*), de l'hydroxyanisole butylé (BHA*), de l'hydroxytoluène butylé (BHT*) et du gallate de propyle (PG*). L'étude a été réalisée sur la lignée MDA-kb2 de cellules cancéreuses de sein humain. Lorsque ces cellules sont exposées à un agoniste du récepteur d'androgènes (AR*), le gène rapporteur s'exprime en codant pour la luciférase*, enzyme dont l'activité peut être évaluée par mesure de la luminescence.

Les auteurs rapportent une faible activité anti-androgénique du BuPB, du BHA et du BHTet des mélanges binaires de ces composés (BuPB + BHA, BuPB + BHT et BHA + BHT) en présence d'un agoniste fort des récepteurs aux androgènes, la DHT*. En effet, pour les cellules exposées aux mélanges binaires contenant du BuPB avec BHA ou BHT, une baisse du signal (induit par la DHT) atteint la ligne de base. Cette baisse était moins forte (jusqu'à 15%) pour les cellules exposées au mélange BHA+BHT. Les modèles mathématiques d'addition des concentrations et d'addition des effets ont été évalués par rapports aux résultats expérimentaux. Une bonne corrélation a été obtenue entre ces résultats et les estimations basées sur le modèle d'addition des concentrations. Cette corrélation était très significative pour les mélanges BuPB + BHT, BuPB + BHA, et BHA+BHT.

Commentaire

Dans cette étude, les activités anti-androgéniques de quatre perturbateurs endocriniens parmi les plus utilisés dans les industries alimentaires et de produits cosmétiques ont été étudiées. Les produits ont été testés individuellement afin de déterminer les concentrations à tester qui n'altèrent pas la viabilité cellulaire de la lignée utilisée. Ceci a néanmoins limité la gamme des concentrations pouvant être testées. L'évaluation des modèles mathématiques à montré une corrélation très significative pour les mélanges BuPB+BHT, BuPB+BHA, et BHA+BHT, ce qui suggère que ces composés agiraient sur l'activité anti-androgénique d'une manière additive. Cependant, les mélanges binaires contenant du PG n'ont pas pu être évalués car ce composé produit individuellement un très faible effet ne permettant pas de déterminer la concentration efficace médiane ou la concentration inhibitrice médiane nécessaire à l'évaluation des modèles mathématiques. L'emploi d'une autre lignée cellulaire plus sensible pourrait pallier ce problème.

Par ailleurs, dans cette étude, seuls les mélanges binaires ont été testés, alors que l'exposition réelle pourrait être plus complexe. En effet, l'Homme peut être exposé simultanément à plusieurs PE via son alimentation, l'utilisation de produits cosmétiques ou provenant de son environnement. En outre, l'utilisation d'une lignée cellulaire cancéreuse avec un système de gène rapporteur, bien que très utile pour tester les potentialités d'interactions entre un récepteur et ses ligands, ne peut rendre compte des interactions biochimiques et physiologiques susceptibles de se produire chez l'Homme.

Conclusion générale

Les deux études présentées ont évalué le potentiel de perturbateur endocrinien et/ou reprotoxique* de mélanges binaires de substances auxquelles la population générale est exposée via son alimentation ou son environnement. La première a mis en évidence un effet toxique significativement plus élevé sur l'appareil reproductif mâle de rats exposés aux mélanges de BPA et DES par rapport aux groupes de rats mono-exposés, alors que la deuxième a montré que les mélanges binaires de BuPB, BHT et BHA pourraient exercer un effet anti-androgénique additif. Dans les deux cas, les résultats suggèrent que l'exposition simultanée à ces produits engendrerait des interférences pouvant aboutir à l'accentuation de l'effet toxique initial observé en mono-exposition.

L'étude des effets de mélanges plus complexes dont le choix pourrait être guidé par les données récentes d'exposome humain, permettraient de se rapprocher des conditions réelles de l'exposition humaine à ces produits et offrirait aux préventeurs des informations très utiles pour une évaluation plus pertinente des risques.

GENERAL CONCLUSION

Both studies presented in this note have evaluated endocrine disruptive or reprotoxic effects of binary mixtures of substances to which the general population is exposed through the diet or the environment. The first study has shown that combined exposure to BPA and DES resulted in significantly higher toxic effects on the male rat's reproductive system. Similarly, the second paper reported that exposure to binary mixtures of BuPB, BHT and BHA could produce additive anti-androgenic effect. In both cases, these results suggest that simultaneous exposure to these compounds could generate interferences that enhance the initial toxic effect observed in single exposure essays.

Based on recent human exposome, investigating more complex mixtures would provide more useful information and allow a more efficient chemical hazards prevention.

Lexique

Androgen receptor (AR): récepteur aux androgènes.
Butylparabène (BuPB): agents de conservation très utilisé dans les produits de beauté et qui appartient à la famille des parabènes.
Butylated hydroxyanisole (BHA) : hydroxyanisole butylé, mélange des deux isomères 2-BHA et 3-BHA, très utilisé comme conservateur alimentaire, et également dans les produits cosmétiques.
Butylated hydroxytoluene (BHT): hydroxytoluène butylé, utilisé comme conservateur alimentaire et anti-oxydant dans les produits cosmétiques.
Bisphénol A (BPA): substance utilisée comme réactif de réticulation dans la fabrication des matières plastiques polycarbonates et des résines époxy. La DJA a été abaissée de 50 à 4 µg/Kg/j par l'EFSA en janvier 2015.
Diéthylstilbestrol (DES): molécule de synthèse ayant des propriétés œstrogèniques, qui était prescrit aux femmes enceintes pour prévenir les fausses-couches récurrentes, et qui s'est avéré être reprotoxique et un contaminant pour l'environnement.
5-alpha-Dihydrotestosterone (DHT): hormone androgène qui a une forte affinité pour les récepteurs androgènes.
Luciférase : enzyme qui catalyse la réaction d'oxydation de la luciférine en oxyluciférine. Il en résulte l'émission d'un photon dont la lumière résultante est jaune-verte. Le gène de la luciférase est utilisé en biologie moléculaire comme marqueur. Il est inséré à l'intérieur d'un autre gène, et si ce dernier est activé, le gène marqueur est transcrit et traduit en même temps que le gène dans lequel il a été inséré
Perturbateur endocrinien (PE): substance ou mélange exogène, possédant des propriétés susceptibles d'induire une perturbation endocrinienne dans un organisme intact, chez ses descendants ou au sein de (sous)-populations.
Propyl gallate (PG): gallate de propyle, anti-oxydant utilisé comme additif alimentaire pour prévenir l'oxydation des matières grasses.
Réticulum endoplasmique (RE): organite propre aux cellules eucaryotes. Il participe à la production de macromolécules, la modification des protéines et le transfert de substances vers l'appareil de Golgi.
Reprotoxique : ce qui est toxique pour la reproduction, c'est-à-dire pouvant altérer la fertilité de l'homme ou de la femme, ou altérer le développement de l'enfant à naître (avortement spontané, malformation…).

Publications de référence

1 Vandenberg LN, Colborn T, et al. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocr Rev* 2012;33 (3):378-455.

2 N'Tumba-Byn T, Moison D, et al. Differential effects of bisphenol A and diethylstilbestrol on human, rat and mouse fetal leydig cell function. *PLoS One* 2012;7 (12):

Autres publications identifiées

Fournier K, Tebby C, Zeman F, et al. Multiple exposures to indoor contaminants: Derivation of benchmark doses and relative potency factors based on male reprotoxic effects. Regul Toxicol Pharmacol 2016; 74 :23-30.
Une benchmark dose (BMD), et les facteurs de puissance relatifs, sont déterminés pour un mélange de composés organiques semi-volatils que l'on trouve dans les habitations et qui ont le même mode d'action pour leur effet sur le système reproductif masculin. Parmi les 58 composés identifiés, 18 induisent une diminution de la testostérone (taux sériques). Parmi ces 18 substances, il est montré que le bisphénol A et le benzo[a]pyrène induisent la plus forte baisse de testostérone.

Gao CJ, Liu LY, Ma WL, et al. Phthalate metabolites in urine of Chinese young adults: Concentration, profile, exposure and cumulative risk assessment. Sci Total Environ 2016; 543 (Pt A):19-27.
Quatorze métabolites de phtalates ont été analysés dans 108 échantillons urinaires obtenus chez de jeunes adultes chinois. Le mBP et le miBP étaient les composés les plus abondants (48% du total des concentrations). L'évaluation du risque cumulé a montré que la moitié de la population étudiée présentait un indice de risque supérieur à la valeur limite.

Liens d'intérêts :

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

Ecotoxicité et comportement environnemental des lanthanides

Davide A.L. VIGNATI | **david-anselmo.vignati@univ-lorraine.fr**

CNRS - Laboratoire des environnements continentaux – LIEC UMR7360 - Metz

Mots clés : **Lanthanides, écotoxicologie, stress, spéciation des éléments**

Le nom lanthanides indique une série de quinze éléments du tableau périodique allant du lanthane (La) au lutétium (Lu). Les lanthanides font partie des éléments qualifiés de stratégiques à cause de leur importance dans plusieurs secteurs économiques tels que les énergies vertes, l'électronique et les applications médicales (1). L'utilisation croissante de ces éléments est en train d'en augmenter les concentrations environnementales et d'en altérer les cycles géochimiques (2) alors que les connaissances sur leur écotoxicité restent encore à affiner (3, 4). De plus, les effets des lanthanides sur les organismes dépendent aussi de leur spéciation* dans les milieux expérimentaux utilisés lors de tests d'écotoxicité (5), ce qui peut compliquer la transposition aux situations naturelles des résultats obtenus en laboratoire (4, 5).
Les publications choisies illustrent le potentiel des lanthanides d'induire des effets précoces sur le développement des organismes, la possibilité d'effets écotoxiques synergiques entre le La et le pH et des avancées sur la connaisance de spéciation des lanthanides avec des implications possibles pour leur impact environnemental.

Toxicité comparée de terres rares choisies : dommages sur l'embryogenèse et la fertilisation des oursins de mer en rapport avec des effets de stress oxydant et cytogénétiques

Pagano G. et al. (2016). Comparative toxicities of selected rare earth elements: Sea urchin embryogenesis and fertilization damage with redox and cytogenetic effects. Environmental Research, vol. 147 : p 453-460.

Résumé

L'écotoxicité de sept terres rares* (Y, La, Ce, Nd, Sm, Eu, Gd) est examinée pour leur capacité à déterminer des effets sur le développement d'embryons, le taux de fertilisation et les marqueurs de stress oxydant dans une espèce d'oursin de mer (*Paracentrotus lividus*). Les expérimentations ont été effectuées dans de l'eau de mer filtrée et dopée avec des concentrations en lanthanides comprises entre 10^{-8} et 10^{-4} M (toutes expériences confondues). Pour Y, Ce et Gd, les concentrations dans les milieux d'exposition ont été vérifiées analytiquement.
Tous les éléments provoquent une altération du développement larvaire, les effets étant proportionnels à la concentration d'exposition. Gd, La et Y sles éléments les plus toxiques avec des CE_{50} de l'ordre de 10^{-7} M. Des effets sur la mitose, les marqueurs de stress oxydant et le taux de fertilisation sont observés à des concentrations entre 10^{-6} et 10^{-4} M. Des effets toxiques transmissibles à la progéniture sont également observés après exposition du sperme de *P. lividus* à des concentrations de 10^{-6} à 10^{-4} M. La vérification analytique des concentrations d'exposition montre qu'elles sont généralement deux fois plus faibles par rapport aux valeurs attendues. Pour ce qui est des paramètres considérés, Gd, Y, Ce et La sont les éléments les plus toxiques, mais la toxicité de chaque élément diffère selon le paramètre pris en considération.

Commentaire

L'étude montre que les terres rares peuvent altérer le fonctionnement cellulaire et le développement des embryons de l'oursin de mer *P. lividus*. L'induction d'effets transmissibles à la progéniture est un point majeur du travail. L'étude a aussi le mérite d'utiliser une matrice (eau de mer filtrée) directement transposable à la réalité environnementale.

D'autre part, les intervalles de confiance sur les CE_{50} sont larges, ce qui doit inviter à la prudence dans l'utilisation des résultats présentés pour une évaluation du risque associé aux lanthanides en milieu marin. Selon les auteurs de l'article, la vérification analytique des concentrations d'exposition confirme les valeurs des CE_{50} obtenues. Toutefois, les valeurs attendues et mesurées différent généralement d'un facteur 2 ; ceci montre l'importance et l'utilité des contrôles dans les études écotoxicologiques sur les lanthanides. Des indications sur la spéciation des éléments examinés dans la matrice d'exposition auraient facilité la comparaison avec des résultats obtenus (ou à venir) dans des milieux d'exposition différents. Un complément d'information pour d'autres lanthanides plus lourds (tels que Er, Yb et Lu) reste nécessaire.

Altérations du calcium libre dans le cytosol des racines de raifort exposées simultanément au lanthane(III) et aux pluies acides

Zhang X. et al. (2016). Alterations in cytosol free calcium in horseradish roots simultaneously exposed to lanthanum (III) and acid rain. Ecotoxicology and Environmental Safety, vol. 126: p 62-70.

Résumé

Ce travail examine les effets combinés d'une exposition au La (irrigation des plantes avec des solutions contenant 20, 100 et 300 mg/L de La) et aux dépositions acides (arrosage

des plantes avec des solutions ajustées à un pH de 4,5 et 3,0) sur la concentration cytosolique du calcium dans les cellules racinaires de raifort (*Armoracia rusticana*). L'activité racinaire, l'accumulation des métaux (La, K, Mg, Ca, Fe, Mn et autres), la biomasse et le pH cytosolique sont déterminés.

L'exposition sur 7 jours à 20 mg/L de La, à des dépositions acides (pH de 4,5) ou à une combinaison des deux montre un effet sur les paramètres examinés, alors que les autres conditions utilisées provoquent une baisse de la concentration du Ca intracellulaire et ont un effet néfaste sur tous les paramètres mesurés. Sept jours après l'interruption du traitement, les paramètres mesurés dans des plantes précédemment exposées au La à 20 mg/L, à des pluies de pH 4,5 ou à une combinaison de deux étaient comparables aux contrôles. Dans les autres cas, une amélioration a été observée, mais les différences par rapport aux contrôles persistaient encore.

Commentaire

Les terres rares, dont le La, sont souvent utilisées pour améliorer le rendement des cultures. Leur utilisation peut donc être effectuée en présence d'autres agents de stress environnemental. En effet, des situations combinant l'exposition aux terres rares et aux pluies acides sont documentées dans des zones agricoles, particulièrement aux USA et en Chine. Les résultats obtenus montrent la présence d'effets synergiques entre les lanthanides et les pluies acides ; ceci confirme le besoin de développer, si possible, des scénarios d'exposition proches de la réalité environnementale. L'attention portée à la spéciation du La dans la préparation des conditions d'exposition reste un exemple à suivre, même si une vérification analytique des concentrations aurait pu être effectuée.

Spéciation de l'Al, du Fe, d'éléments traces et de terres rares selon la méthode de dialyse par membrane de Donnan, dans des eaux de drainage impactées par des sols côtier de plaine riches en sulfates acides

Jones AM. et al. (2016). Donnan membrane speciation of Al, Fe, trace metals and REEs in coastal lowland acid sulfate soil-impacted drainage waters. Science of the Total Environment, vol. 547: p 104-13.

Résumé

Les concentrations et la spéciation de plusieurs éléments traces (dont 10 lanthanides) ont été déterminées dans des eaux d'écoulement (40 échantillons de pH moyen < 4) issues de zones caractérisées par la présence de sols acides riches en sulfates. La spéciation obtenue par dialyse, en utilisant des membranes de type Donnan, est comparée avec celle issue d'un modèle de spéciation (Visual MINTEQ). Les teneurs de Co, Mn, Ni et Zn dépassent les normes fixées par les autorités australiennes et néozélandaises. Les niveaux des lanthanides sont également élevés mais il n'existe pas de valeurs de référence pour ces éléments. La spéciation du Co, Mn, Ni et Zn est dominée par les formes cationiques libres et des complexes avec les sulfates, généralement en accord avec les résultats obtenus par modélisation. En revanche, la spéciation mesurée du Fe, de l'Al et des lanthanides est dominée par des espèces neutres ou chargées négativement. Dans ces cas, les résultats expérimentaux sont différents des prévisions obtenues par modélisation. La présence de nombreux complexes chargés négativement implique une plus forte mobilité environnementale pour ces éléments avec des conséquences écotoxicologiques qui restent à investiguer.

Commentaire

La connaissance de la spéciation des éléments traces, en plus de leur concentration totale, est indispensable pour en prévoir correctement le devenir dans l'environnement. La détermination analytique de la dite spéciation n'est pas toujours possible et les informations correspondantes sont généralement obtenues avec des modèles de spéciation. Ces modèles se basent sur l'utilisation des constantes de complexation* entre un élément et les ligands* présents dans l'environnement. Puisque ces constantes de complexation sont obtenues en laboratoire dans des conditions souvent éloignées de celles du terrain, les résultats obtenus par modélisation nécessitent d'être corroborés, au fur et à mesure des développements méthodologiques, par des vérifications analytiques. Cette étude montre en effet que l'utilisation de résultats issus de la modélisation, et en absence de mesures de la spéciation, peut amener à des conclusions erronées sur la mobilité (et peut être sur les effets) des éléments considérés.

Conclusion générale

Les publications examinées montrent que les lanthanides peuvent induire des effets néfastes à des concentrations variables (de 10-7 à 10-6 M pour l'oursin de mer P. lividus et jusqu'à 10-3 M pour la plante A. rusticana – raifort) selon l'élément et les organismes considérés. Cette variabilité justifie le besoin de travaux supplémentaires pour examiner les effets écotoxiques des éléments, en vue de définir des normes de qualité environnementale. Les possibles synergies entre les effets écotoxiques de ces éléments et d'autres facteurs environnementaux (par exemple les dépositions acides examinées dans la publication de Zhang et al.) doivent aussi être considérées dans la gestion du risque pour les différents milieux naturels.

Il serait aussi judicieux d'associer les études écotoxicologiques sur les lanthanides à l'examen de leur spéciation qui influence fortement les effets biologiques et leur devenir environnemental. Même si la spéciation peut être modélisée à l'aide de logiciels dédiés, un couplage entre approches analytiques et outils de modélisation reste préférable ; les modèles de spéciation les plus couramment utilisés pouvant donner des résultats erronés.

GENERAL CONCLUSION

The selected publications show that lanthanides can negatively affect living organisms at concentrations ranging between 10-7-10-6 M for the sea urchin P. lividus and 10-3 M for the terrestrial plant A. rusticana (horseradish). Such variability justifies the need for more studies examining the ecotoxicity of these elements in order to establish the corresponding environmental quality standards.

Synergistic effects between lanthanides and other environmental stressors seem likely to occur (at least in the case of the interaction between La and acid rain examined in publication number 2) and might be considered to help in the appropriate risk management strategies for various natural environments.

It is also advisable to couple ecotoxicological investigations on lanthanides with the study of their chemical speciation which strongly influences the biological activity and environmental fate of these elements. Depending on technical constraints, the simultaneous use of analytical and modelling approaches to the study of chemical speciation is highly recommended, because the most commonly used chemical speciation models may produce erroneous results.

Lexique

CE_{50} (concentration efficace médiane) : représente la concentration d'une molécule qui provoque 50% de l'effet étudié, dans un cadre biologique et un temps d'exposition définis.

Constante de complexation : dans le cas d'éléments traces, le complexe est un composé chimique formé par l'atome d'un élément lié à d'autres molécules ou ions. Une constante de complexation indique la force de la liaison chimique entre l'atome de l'élément d'intérêt et le ligand.

Ligand : dans ce contexte un ion lié à un élément trace par une liaison chimique.

Spéciation : l'ensemble des formes chimiques (y inclus la répartition entre matière en suspension, colloïdes et solution proprement dite) que peut prendre un élément chimique dans une matrice environnementale (ou dans un milieu de laboratoire).

Terres rares : groupe d'éléments ayants des propriétés similaires et qui comprend le scandium (Sc), l'yttrium (Y) et 15 lanthanides.

Publications de référence

1 US Environmental Protection Agency. Rare Earth Elements: a Review of Production, Processing, Recycling, and Associated Environmental Issues. EPA 600/R-12/572, 2012.

2 Kulaksız S, Bau M. Anthropogenic dissolved and colloid/nanoparticle-bound samarium, lanthanum and gadolinium in the Rhine River and the impending destruction of the natural rare earth element distribution in rivers. *Earth and Planetary Science Letters* 2013; 362 :43-50.

3 Pagano G, Guida M, Tommasi F, Oral R. Health effects and toxicity mechanisms of rare earth elements Knowledge gaps and research prospects. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2015; 115: 40-48.

4 Herrmann H, Nolde J, Berger S, Heise, S. Aquatic ecotoxicity of lanthanum – A review and an attempt to derive water and sediment quality criteria. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2016; 124: 213-38.

5 Gonzalez V, Vignati DAL, Leyval C, Giamberini L. Environmental fate and ecotoxicity of lanthanides: Are they a uniform group beyond chemistry? *Environment International* 2014; 71 : 148-57.

Liens d'intérêts :

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

Fracturation hydraulique : quel risque pour les générations futures ?

Catherine VIGUIE |**Catherine.viguie@toulouse.inra.fr**

Inra - UMR 1331 Toxalim - Toulouse

Mots clés : **Fracturation hydraulique, mélanges, perturbateurs endocriniens, reprotoxique**

La fracturation hydraulique* permet d'accéder à des réserves d'énergies fossiles jusque-là inaccessibles. Cette technologie présente de nombreux enjeux écologiques et sanitaires pour la santé humaine et animale, qui sont peu ou mal évalués. L'une des questions particulièrement préoccupantes concerne la contamination potentielle des eaux de surface et/ou des nappes phréatiques par les fluides de fracturation et/ou les eaux usées contenant des contaminants de fluides de fracturation et des contaminants naturels (radioéléments, métaux lourds par exemple). En effet, des observations épidémiologiques récentes font état d'une augmentation de l'incidence des naissances avant terme et de grossesses à risque chez les femmes exposées (1). Les deux publications présentées proposent deux approches complémentaires d'évaluation en première intention, du danger lié à la contamination des ressources hydriques par des composés reprotoxiques (1) et/ou perturbateurs endocriniens*(2). La première publication apporte des éléments de plausibilité d'un effet néfaste sur la reproduction ou le développement, d'après une analyse portant sur des bases de données relatives aux substances reprotoxiques. La seconde publication apporte des éléments de preuve biologique indiquant que l'activité de traitement/recyclage des eaux de fracturation hydraulique peut conduire à une contamination des eaux de surface par des composés susceptibles d'interagir avec des récepteurs du système endocrinien.

Evaluation systématique des contaminants chimiques de liquides et eaux usées de fracturation hydraulique pour leur toxicité sur la reproduction et le développement

Elliot EG. et al. (2016*).* A systematic evaluation of chemicals in hydraulic-fracturing fluids and wastewater for reproductive and developmental toxicity. Sci Total Environ. Vol.1: p 1-10

Résumé

Cette publication décrit une approche globale qui combine le recensement de composés chimiques des fluides ou de contaminants d'eaux usées de fracturation hydraulique* à partir de bases de données préétablies, et l'analyse systématique des données toxicologiques pour la reproduction ou le développement, à partir de la base de données « Reprotox »(3). Les auteurs ont fait l'inventaire, à partir de la base de données de l'US EPA*, des composés chimiques présents dans des fluides et/ou des eaux usées de fracturation hydraulique (1021 composés identifiés). Ces composés ont été passés au crible de la base de données « Reprotox » qui recense les données toxicologiques disponibles en matière de reproduction et développement. De même, le recensement des valeurs toxicologique de référence (4) ou de normes ou recommandations officielles en lien avec la qualité de l'eau a été fait pour ces substances. Les auteurs indiquent l'absence de données toxicologiques pour 76% des composés ; pour les autres composés (240), des propriétés toxiques pour la reproduction et/ou le développement ont pu être identifiées dans « Reprotox » pour 157 d'entre eux, dont 67 seulement faisaient l'objet d'une réglementation ou de recommandations pour la qualité de l'eau. Les auteurs proposent leur approche comme étape initiale de la priorisation des contaminants de l'eau en lien avec la fracturation hydraulique pour de futures évaluations toxicologiques, notamment dans les eaux potables et par rapport à un danger pour la santé de la reproduction et du développement.

Commentaire

Cette étude a le mérite d'intégrer plusieurs indicateurs concernant d'éventuels effets sur la reproduction et le développement, à travers la contamination des ressources en eau, et se veut systématique. Toutefois, le manque d'informations de la part des industriels concernant la composition et les tonnages en fluides de fracturation et le manque de données toxicologiques limitent fortement le caractère exhaustif de cette étude. Il n'en demeure pas moins qu'elle représente une première tentative intéressante de hiérarchisation de l'évaluation des composés en prenant en compte des données bien établies.

Une des limites de l'étude réside dans le fait que l'unique base de données utilisée pour l'évaluation des propriétés reprotoxiques recense des études de type BPL* basées sur des exigences réglementaires strictes en matière de traçabilité et auxquelles très peu d'études scientifiques de bon niveau souscrivent. Il y a donc là une perte importante d'informations scientifiques qui pourraient se révéler critiques. Enfin, cette approche est limitée du fait qu'elle est basée sur une évaluation des contaminants un par un et n'intègre donc pas les possibilités d'interactions qui peuvent exister au sein de mélanges aussi complexes.

Activités endocrines d'eaux de surface à proximité d'une installation de traitement d'eaux usées provenant de l'industrie d'hydrocarbures en Virginie occidentale

Kassotis CD. et al. (2016). Endocrine disrupting activities of surface water associated with a West Virginia oil and gas industry wastewater disposal site. Sci Total Environ, vol. 557-558: p 901-10.

Résumé

Le traitement des eaux résiduelles de puits de fracturation hydraulique aux États-Unis repose essentiellement sur l'injection de ces eaux contaminées dans des puits souterrains. Très peu de données sont disponibles concernant l'impact de ces injections souterraines sur la qualité des eaux de surface. Cette étude avait pour objectif d'évaluer les propriétés de perturbateurs endocriniens d'eaux de surface en amont et en aval d'un site de traitement d'eaux usées résiduelles de puits de fracturation hydraulique. Des tests de criblage biologique *in vitro*[*] ont été utilisés afin de déterminer les propriétés agonistes[*] ou antagonistes[*] de 5 types de récepteurs hormonaux: hormones thyroïdiennes[*], glucocorticoïdes surrénaliens[*], œstrogènes[*], progestérone[*] et androgènes[*](2). Les eaux des sites situés en aval de la station présentaient une activité antagoniste pour les cinq récepteurs, beaucoup plus importante que pour les eaux contrôles. Cette activité inhibitrice a été traduite en concentration équivalente des molécules antagonistes de référence. Les concentrations ainsi calculées étaient dans la gamme de concentration connue pour leur impact négatif sur la reproduction et/ou le développement de la faune aquatique. Par contre, les propriétés agonistes des eaux en aval se sont révélées beaucoup plus faibles et globalement inférieures à celles mesurées sur un ou des sites contrôles.

Commentaire

La méthode de criblage proposée repose sur la mesure d'une activité biologique, ce qui est adapté à l'évaluation de mélanges chimiques complexes et permet d'identifier un danger sans présumer de la nature chimique des composés. Cependant, on peut toutefois regretter que les auteurs n'aient pas introduit dans leur analyse des échantillons d'eaux potables provenant du même bassin hydrique afin de préciser le risque pour les populations humaines vivant dans cette zone.

Une des limites majeures concerne la contribution exacte des eaux usées de fracturation à l'activité mesurée, étant donné que la station traite d'autres déchets industriels. Il semblerait que la teneur élevée des échantillons en sodium, chlore, strontium et baryum soit un indicateur fiable d'une contribution réelle des eaux de fracturation (5).

Conclusion générale

L'exploitation « non conventionnelle » par fracturation hydraulique d'énergies fossiles, jusque-là inaccessibles, est la source de conflits entre enjeux économiques d'une part et enjeux sanitaires pour la santé humaine/animale et environnementale d'autre part. L'évaluation scientifique et objective du risque toxicologique associé à cette technique apparait donc comme une nécessité urgente pour garantir le maintien de l'équilibre entre ces différents enjeux. Une meilleure caractérisation des dangers et des facteurs de risque permettrait d'améliorer l'encadrement de ce procédé hydraulique, tout en contribuant aux évolutions technologiques vers des procédés plus « propres ». Les deux publications analysées soulèvent le manque de données scientifiques et de terrain pour un danger actuellement très peu exploré : la contamination des ressources hydriques par des composés PE ou reprotoxiques.

La première publication, qui s'appuie sur des données bibliographiques, recense la présence de nombreux composés potentiellement reprotoxiques dans les mélanges de fluide de facturation et/ou les eaux usées issues de ce procédé. La deuxième publication apporte quant à elle des éléments de preuves biologiques suggérant que des composés à activités endocrines sont présents dans les eaux résiduelles avec des niveaux d'activité potentiellement préjudiciables à la faune aquatique. Ces deux approches complémentaires apportent des éléments pour l'évaluation du risque pour l'environnement et la santé de la fracturation hydraulique à travers la contamination des ressources hydriques par des contaminants PE et/ou reprotoxiques. Toutefois, les approches proposées, si elles ont valeur de signal d'alerte, restent encore trop préliminaires pour évaluer un risque global. De plus amples investigations toxicologiques et de terrain sont indispensables pour mieux caractériser ce danger et le risque associé, afin de prémunir les écosystèmes les populations sensibles, et pour faire évoluer cette technologie vers un moindre risque.

GENERAL CONCLUSION

The unconventional extraction of hydrocarbures using hydraulic fracturing is a source of major conflicting confrontations between on the one hand, economical and industrial issues and in the other hand, sanitary health and environmental issues. There is an urgent need for an accurate state of knowledge based on independent scientific evaluation to guaranty the balance between thes conflicting issues. A better characterization of the dangers and the risk factor associated to hydraulic fracturing should allow more comprehensive guidelines and legislative frame to be developed for the use and the development of this industrial practice and its technologic evolution toward safer practices. The two referenced publications highlight the dramatic lack of scientific and field data and address a so far poorly investigated potential danger: the contamination of water resources by compounds with endocrine disruptor and/or reprotoxic properties.

The first publication is a systematic analysis and screening of individual chemical compounds identified as components of fracturing fluid or wastewaters for their reprotoxic properties based on the analysis of the "Reprotox" database from the Reproductive Toxicology Center. The second paper, brings some biological evidences that the process of hydraulic fracturing can be associated with the contamination of hydric resources by compounds or mix exhibiting clear hormonal antagonistic activities. The two approaches can be used as a base to establish alert signals. They remain however very preliminary and do not allow to determine the global risk. It is clear that further detailed toxicological and field investigations are required for a more comprehensive understanding of the health and environmental risks associated to the contamination of water resources by endocrine disrupting compound from fracturing fluid or wastewater.

Lexique

Agoniste : substance qui se fixe sur un récepteur cellulaire, dont il n'est pas le ligand naturel. Il produit, au moins en partie, les mêmes effets que le ligand naturel.
Androgène : hormone stéroïde masculine produite notamment par les testicules et qui influence toute l'activité de reproduction.
Antagoniste : molécule interagissant avec un récepteur d'une molécule endogène pour en bloquer ou en diminuer (inhibe) les effets physiologiques.
Bonnes pratiques de laboratoire (BPL) : système de garantie de la qualité portant sur le mode d'organisation des études de sécurité non cliniques relatives à la santé humaine et animale, à l'environnement et portant sur les conditions dans lesquelles ces études sont planifiées, réalisées, contrôlées, enregistrées, rapportées, archivées et diffusées. Les dispositions de ces bonnes pratiques sont établies par la directive du Parlement et du Conseil 2004/10/CE du 11 février 2004.
Fracturation hydraulique : dislocation ciblée de formations géologiques peu perméables, en injectant sous très haute pression, un fluide destiné à fissurer et micro-fissurer la roche.
Glucocorticoïdes : hormones produites par la partie corticale des glandes surrénales en réponse à des stress ou une inflammation et dotées de propriétés anti-inflammatoires et sur le métabolisme, par exemple, la cortisone.
Hormones thyroïdiennes : hormones iodées produites par la glande thyroïde et intervenant dans le métabolisme, la croissance et le développement du système nerveux.
In vitro : expériences pratiquées au laboratoire, en dehors d'un organisme vivant.
Œstrogène : hormone stéroïde féminine produite notamment par les ovaires et qui influence toute l'activité de reproduction et le développement.
Perturbateur endocrinien (PE): molécule qui mime, inhibe ou modifie l'action d'une hormone et perturbe le fonctionnement normal d'un organisme.
Progestérone : hormone stéroïde féminine produite notamment par les ovaires après l'ovulation et qui est essentielle au maintien de la gestation.
United States Environmental Protection Agency (agence de protection de l'environnement des Etats Unis) : US EPA

Publications de référence

1 Casey JA, Savitz DA et al. Unconventional Natural Gas Development and Birth Outcomes in Pennsylvania,USA. Epidemiology. 2016 Mar;27(2):163-72

2 Kassotis CD, Klemp KC et al. Endocrine-Disrupting Activity of Hydraulic Fracturing Chemicals and Adverse Health Outcomes After Prenatal Exposure in Male Mice. Endocrinology. 2015

3 Reproductive Toxicology Center: REROTOX®
https://reprotox.org/

4 Yost EE, Stanek J et al. Overview of Chronic Oral Toxicity Values for Chemicals Present in Hydraulic Fracturing Fluids, Flowback, and Produced Waters. Environ Sci Technol. 2016 May 3;50(9):4788-97

5 Akob DM, Cozzarelli IM et al. Organic and inorganis composition and microbiology of produced waters from Pensylvania shale gas wells. Appl Geochem, 2015; 60: 116-125.

Revues de la littérature

Carpenter DO. Hydraulic fracturing for natural gas: impact on health and environment. Rev Environ Health. 2016 Mar 1;31(1):47-51

Kassotis CD, Tillitt DE et al. Endocrine-Disrupting Chemicals and Oil and Natural Gas Operations: Potential Environmental Contamination and Recommendations to Assess Complex Environmental Mixtures. Environ Health Perspect. 2016 Mar;124(3):256-64

Wattenberg EV, Bielicki JM et al. Assessment of the Acute and Chronic Health Hazards of Hydraulic Fracturing Fluids. J Occup Environ Hyg. 2015;12(9):611-24

Liens d'intérêts :

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

Nouvelle approche métabolomique appliquée à la mesure de l'exposition aux faibles doses de contaminants chimiques: incidence des pesticides et POP sur l'obésité et le diabète de type 2

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

CNRS - Laboratoire IMRCP, UMR5623 - Toulouse

Mots clés : **Adiponectine, insuline, métabolomique, organochlorés, organophosphorés, pesticides, polluants organiques persistants**

Le nombre de cas d'obésité mondiale a doublé depuis 1980 et triplé chez les enfants. Le plus souvent l'évolution de la prévalence du diabète se superpose à celle de l'obésité. Les causes de cette épidémie de diabète de type 2, touchant plus de 5% de la population Française, restent complexes et la suralimentation et le mode de vie sédentaire ne peuvent pas, à eux seuls, l'expliquer. Les perturbateurs endocriniens* (PE), ubiquitaires dans notre environnement, sont capables de modifier certaines voies de signalisation cellulaire du métabolisme du glucose et des lipides. Chez l'Homme, des études épidémiologiques ont montré un lien direct entre l'exposition à certains polluants organiques persistants* (POP), dont les insecticides organochlorés* (OC) et les polychlorobiphényles* (PCB) et la survenue d'un syndrome métabolique* ou d'un diabète de type 2, dans les années qui suivent une exposition aigüe (1). Les restrictions dans l'utilisation des OC et des PCB, liées à la convention de Stockholm de 2001 ont entrainé une diminution de ces polluants, mais certains métabolites du DDT tel le dichlorodiphényldichloroéthylène (p,p'-DDE) et l'hexachlorobenzène (HCB) ou les PCB, persistants et bioaccumulables, sont encore retrouvés dans de nombreux organismes vivants. Pour les pesticides organophosphorés (OP), il n'existe pas aujourd'hui de consensus sur les conséquences pour l'Homme, liées à une exposition prénatale à ces substances, alors que des études sur l'animal ont montré un effet (2). Il est apparu nécessaire de développer de nouveaux outils d'investigations, permettant de relier de faibles doses de polluants chimiques à des effets mesurables sur la santé humaine. C'est dans ce contexte que la première publication de cette note, une étude métabolomique* chez l'adulte menée par Salihovic et al. (mars 2016), cherche à identifier les signaux enzymatiques, métaboliques et hormonaux perturbés par des faibles doses d'OC. Dans la seconde publication, Debost-Legrand et al (avril 2016), cherchent à relier l'exposition prénatale à des cocktails complexes de faibles doses de POP, OC et OP et la modification dans la sécrétion de deux hormones du métabolisme du glucose: l'insuline et l'adiponectine. Ces deux études permettent de passer de l'analyse des effets épidémiologiques, souvent liés à des expositions aiguës, à l'identification des mécanismes de signalisation cellulaire grâce au métabolome, modifié par une exposition à un ou plusieurs agents chimiques. Ce changement d'échelle représente une avancée majeure dans l'approche des effets moléculaires exercés par de faibles doses de mélanges complexes. Dans les deux publications présentées, c'est le métabolisme du glucose et des lipides qui semble être le plus impacté par ces cocktails de polluants, renforçant l'hypothèse d'une incidence continue de certains perturbateurs endocriniens, OC et OP sur le diabète de type 2 et l'obésité.

Effet métabolomique de l'exposition au p,p'-DDE et HCB chez l'Homme.

Sauhovic S. et al. (2016). The metabolic fingerprint of p,p'-DDE and HCB exposure in humans. Environ Int, vol. 88: p 60-66.

Résumé

L'étude menée en Suède sur un échantillon de 1016 participants a pour objet d'établir un lien entre une exposition à des pesticides OC et une modification d'une carte métabolique très étendue. Pour ce faire, les auteurs ont analysé les échantillons de sérums, stockés d'une étude précédente menée en 2001, portant sur l'analyse des causes de pathologies cardiovasculaires chez les personnes âgées (>70 ans). Dans cette étude, les deux OC suivis sont l'HCB et le p,p'-DDE. Les taux sériques des deux OC sont déterminés après une préparation d'échantillon SPE* et analysés par GC-HRMS* en mode SIM*. Cette technique permet d'obtenir des limites de détection (LOD), normalisées par rapport aux lipides sériques (g.l.s) : 2.13 ng/g.l.s pour p,p'-DDE et 14.1 ng/g.l.s pour HCB. Pour constituer une carte métabolique de chaque participant, les auteurs ont réalisé une analyse métabolomique non ciblée, par couplage UPLC-HRMS*. La méthode proposée par les auteurs assure la détection de 7522 métabolites par comparaison des masses mono-isotopiques*. En ajoutant deux niveaux d'identification avec la comparaison des profils de fragmentation et des grandeurs de rétention UPLC, les auteurs ont correctement attribué 204 structures. Pour établir un lien entre les métabolites analysés et les taux sériques des deux OC, une régression multivariable est réalisée après transformation logarithmique des concentrations normalisées des deux OC et introduction des con-

centrations des 204 métabolites identifiés dans la régression. Pour éviter des influences extérieures à la seule exposition aux OC, les auteurs ont pris en compte des données liées au niveau d'études, tabagisme, activité physique et quantité d'alcool et d'énergie absorbée. Une correction de Bonferroni* a été appliquée pour ces tests multiples afin d'éviter un trop fort taux de faux positifs. Les résultats obtenus montrent un taux médian de p,p'-DDE de 309 ng/ g.l.s et de HCB de 40.8 ng/g.l.s. Concernant les 204 métabolites identifiés, ils représentent une grande diversité de voies métaboliques: acides aminés et leurs dérivés, peptides, stéroïdes et leurs dérivés, alcools et polyols, sels biliaire, acides gras, glycérophospholipides, sphingolipides* et glycérolipides*. Cette étude montre une association significative entre le taux de p,p'-DDE détecté et 11 métabolites impliqués dans le métabolisme des lipides: 3 acides gras, 2 sphingolipides, 1 monoglycéride*, 4 glycérophospholipides et 1 flavonoïde*, un métabolite d'origine végétale apporté par l'alimentation qui semble s'accumuler parallèlement au p,p'-DDE. Pour l'expo sition au HCB, un lien est retrouvé avec 5 métabolites lipidiques: 1 dérivé de l'acide cinnamique*, 1 acide gras, 3 glycérophospholipides. L'exposition au p,p'-DDE entraine une diminution du taux des 8 métabolites lipidiques et une augmentation pour 3 parmi les 11 identifiés, alors que des taux croissants de HCB sont reliés une élévation du taux des 5 métabolites lipidiques.

Commentaire

Cette étude représente la première étude métabolomique à large échelle (1016 participants, 7522 métabolites tracés), cherchant à relier les taux circulants de deux pesticides OC à une modification des profils métaboliques. Le premier résultat marquant de l'étude est le taux très élevé (100%) de détection des deux OC dans l'ensemble des participants, démontrant la bioaccumulation et la persistance du HCB et du p,p'-DDE. L'approche métabolomique de cette étude est particulièrement pertinente, puisque des taux d'OC circulant peuvent être reliés à une variation de la concentration de métabolites spécifiques. Dans une première catégorie, une augmentation du taux de p,p'-DDE est associée à une diminution du taux de quatre glycérophospholipides, deux sphingolipides et deux acides gras, alors que le taux d'une autre famille d'acides gras, (1 monoglycéride) est significativement augmenté. Ce résultat suggère plusieurs récepteurs au p,p'-DDE couplés à des voie d'activation et de désactivation. Différentes études épidémiologiques, comme celles menées en 2014 par Floegel et al. (3) ou Ganna et al. (4) ont démontré le lien entre des taux faibles de différentes classes de phosphatidylcholines, sphingomyélines ou flavonoïdes et le diabète de type 2 ainsi que certaines affections coronariennes. En 2011, Floegel et al. (5) ont démontré l'implication des lysophosphatidylcholines dans certains processus de signaux cellulaires et des transporteurs d'acides gras au sein des tissus, en association avec le phosphatidylglycérol. Les résultats obtenus par les auteurs suggèrent que certains perturbateurs endocriniens, tel le p,p'-DDE, influençant le taux de lysophosphatidylcholines circulant, peuvent jouer un rôle dans le développement de certaines affections cardiométaboliques dans lesquelles ces médiateurs sont impliqués. Les auteurs montrent qu'une exposition au p,p'-DDE entraine une élévation du taux de monoacylglycérol, qui joue un rôle essentiel de médiateur chimique contrôlant la sécrétion d'insuline et l'obésité chez la souris (6). Concernant l'exposition au HCB, la majorité des métabolites perturbés, sont impliqués dans le métabolisme des lipoprotéines du plasma, qui assurent le contrôle du métabolisme lipidique global d'un individu. Les résultats obtenus dans cette étude confirment les travaux menés par Wu et al. en 2013 (7), qui avaient montré l'impact d'une exposition au HCB sur les taux de lipides sériques, cholestérol, triglycérides ainsi qu'une incidence sur le développement d'un diabète de type 2. Ces résultats permettent d'identifier les métabolites impactés par une exposition aux deux OC et confirment les études récentes de la littérature. La cartographie métabolique utilisée pourrait être appliquée à de nouvelles études, sur une population plus diversifiée (âge, état de santé général, pays). Cette méthodologie pourrait être étendue à tous les perturbateurs endocriniens suspectés, afin d'identifier précisément les signalisations cellulaires et enzymatiques affectées.

Exposition prénatale aux polluants organiques persistants et aux pesticides organophosphorés et effets sur les marqueurs du métabolisme du glucose à la naissance

Debost-Legran A. et al. (2016). Prenatal exposure to persistent organic pollutants and organophosphate pesticides, and markers of glucose metabolism at birth. Environ Res, vol. 146: p.207-217.

Résumé

Cette étude s'est intéressée à l'évaluation de différents biomarqueurs fœtaux du métabolisme du glucose, et aux effets d'une exposition prénatale aux POP et aux OP. Les auteurs ont utilisé les échantillons collectés auprès de 3421 femmes enceintes constituant la cohorte PELAGIE*. Les échantillons d'urine prélevés en début de grossesse, ont été analysés par LC-MS/MS*, afin de doser six métabolites dialkylphosphate (DAP) communs aux OP : diethyl phosphhate (DEP), diethyl thiophosphate (DETP), diethyl dithiophosphate (DEDTP), dimethyl phosphate (DMP), dimethyl thiophosphate (DMTP) et dimethyl dithiophosphate (DMDTP). L'étude a également permis de doser neuf congénères de PCB et trois OC: le beta-hexachlorocyclohexane (βHCH), le p,p'-DDE et l'HCB. Concernant les biomarqueurs du métabolisme du glucose, les auteurs ont dosé l'insuline par une technique immuno-radiométrique* et l'adiponectine par une technique ELISA*, à partir du sang de cordon de 268 nouveau-nés. Les DAP sont retrouvés dans 92% des échantillons d'urine avec une concentration médiane de 38.8 nmol/L. Les métabolites de DMP, DMTP et DMDTP sont majoritaires avec une concentration médiane de 30.6 nmol/L. Les pesticides OC et huit PCB sont retrouvés dans 74% des échantillons de sang de cordon. Le congénère PCB153 est retrouvé dans 100% des échantillons sanguins. Pour l'ensemble des 268 échantillons, le p,p'-DDE est le métabolite majoritaire, avec une concentration médiane de 0.19 µg/L. L'étude montre une augmentation significative (> 25%) du taux d'insuline dans le sang de cordon, quand la concentration en DAP augmente de 14.6 à 85.6 nmol/L. Ce phénomène est plus marqué avec une augmentation des métabolites de DMP, DMTP et DMDTP. Le taux d'insuline diminue de 15% quand la concentration en

PCB des congénères 118, 138 et 170 passe de 0.2 à 0.46 nmol/L. Pour le congénère 153, la variation est de 28% dans la gamme de concentration 0.07 – 0.15 µg/L. Pour l'adiponectine, aucune interaction n'est observée avec cette même classe de DAP et PCB. Pour les OC, une diminution significative (27%) du taux d'insuline et (19%) du taux d'adiponectine est observée en lien avec une exposition au p,p'-DDE, dans la gamme 0.1-0.29 µgl/L, mais seulement chez les filles.

Commentaire

L'étude montre le lien qui existe entre une exposition prénatale à des pesticides persistants OC ainsi qu'à des PCB et le taux d'insuline et d'adiponectine mesuré à la naissance. Un premier résultat important montre que pour 100% des 268 échantillons de sang de cordon analysés, le congénère PCB153 est retrouvé à une concentration > 0.110 µg/L. Pour PCB153, le lien entre l'exposition à ce POP et la diminution du taux d'insuline n'est pas influencé par l'indice de masse corporelle de l'enfant à la naissance, suggérant que cette exposition entraine également une diminution du poids du fœtus. Cette hypothèse formulée par les auteurs, se retrouve dans les travaux de Casas et al. menés en 2015, démontrant le lien entre l'exposition au PCB153 et la diminution du poids de l'enfant à la naissance (8). Pour l'adiponectine, un effet marqué est observé pour l'exposition au p,p'-DDE, uniquement chez les filles. Ces résultats confortent ceux obtenus en 2012 par Valvi et al. (9) qui avaient démontré le lien entre une exposition au p,p'-DDE et le surpoids observé uniquement chez les jeunes filles. Une diminution du taux d'adiponectine en lien avec un taux élevé de p,p'-DDE avait également été associé à une augmentation du ratio de nouveau-nés prématurés par Martos-Moreno et al. (10). Dans cette même étude, Martos-Moreno et al suggéraient que la diminution de sécretion d'adiponectine était également liée à une diminution du métabolisme du glucose. Ces résultats, corrélés à ceux obtenus dans cette publication, montrant une diminution du taux d'insuline liés à une exposition au p,p'-DDE chez les filles, sont en accord avec ceux obtenus par La Merill et al. en 2014, montrant chez la souris exposée au DDT, une diminution de la thermogénèse et du métabolisme du glucose et des lipides (11). Le taux d'insuline à la naissance est également très influencé par le taux urinaire de DAP de la mère au début de la grossesse. Ce résultat démontre les effets d'une exposition prénatale et sont en accord avec les travaux de Lasram et al. (12) qui avaient observé le lien entre le taux de DAP, l'hyperglycémie et le diabète de type 2 chez l'adulte. Un point fort de cette étude est le nombre important de contaminants suivis, mettant en avant les effets croisés des mélanges de polluants, mais l'étude devra être approfondie en élargissant le nombre de marqueurs métaboliques. Le nombre d'échantillon et la couverture géographique devront également être étendus pour bien identifier toutes les voies métaboliques altérées par des doses faibles d'exposition.

Conclusion générale

Les deux articles présentés dans cette note montrent l'apport de l'approche métabolomique, qui consiste à identifier et quantifier les métabolites présents dans une cellule, un tissu, un organe ou un organisme, dans l'analyse des effets d'une exposition à différents agents chimiques. L'étude menée par Salihovic et al. a permis de concevoir une carte non ciblée de plus de 200 métabolites caractéristiques de chaque individu. A partir de cette cartographie, il a été possible d'identifier plusieurs récepteurs spécifiques du p,p'-DDE. Cette molécule qui a déjà été identifiée comme possédant un effet anti-androgénique, a présenté ici un effet sur le métabolisme des lipides. Pour le second pesticide OC étudié, l'HCB, une autre voie de contrôle du métabolisme lipidique est perturbée, par l'intermédiaire de métabolites régulant des lipoprotéines du plasma. Cette étude a montré que la totalité des 1016 participants ont des taux sériques élevés de HCB (40.8 ng/g.l.s) et de p,p'-DDE (309 ng/g.l.s). Dans l'étude menée par Debost-Legrand *et al.* l'approche métabolomique a été appliquée au suivi particulier de deux hormones, impliquées dans le métabolisme du glucose : l'insuline et l'adiponectine. Cette étude ciblée à montré qu'il est possible de suivre les effets d'un grand nombre de contaminants très variés : des pesticides OP et OC et plusieurs congénères PCB. Les résultats montrent que la totalité des 268 échantillons de sang de cordon analysés ont des taux élevés de PCB153 (> 0.11µg/L). Il apparait également que ce PCB particulier entraine une diminution de 28% du taux d'insuline à la naissance, en fonction de la concentration. Ici aussi le p,p'-DDE montre une forte influence sur le taux d'insuline et d'adiponectine avec des concentrations comprises entre 0,1 et 0,29 µg/L. Concernant les pesticides OP, le taux d'insuline à la naissance est très influencé par le taux urinaire de DAP en début de grossesse.

Au-delà de la toxicité aiguë de l'ensemble des agents chimiques étudiés ici, l'approche métabolomique a démontré d'autres effets induits par ces perturbateurs endocriniens. Ces effets avérés sur le métabolisme du glucose et des lipides incitent les auteurs à incriminer ces agents chimiques dans l'incidence du diabète de type 2 et de l'obésité.

GENERAL CONCLUSION

These two publications show the contribution of the metabolomic approach, which consists in the identification and quantification of the metabolites present in a cell, tissue , organ or living organism, in the determination of the exposure effects to various chemical agents. The study carried out by Salihovic et al. used a not targeted fingerprint of more than 200 metabolites characteristic of each sample. With this fingerprint, it was possible to identify several specific receptors for p,p'-DDE. This molecule which was already identified as anti-androgenic agent, showed in this study, an effect in lipids metabolism. For the second OC pesticide studied, HCB, another way of control is disturbed, with metabolites controlling lipoproteins in plasma. This study showed that all of the 1016 participants have high levels of HCB (40.8 ng/g.l.s) and p,p'-DDE (309 ng/g.l.s). In the study carried out by Debost-Legrand et al., the metabolomic approach was applied to the specific quantification of 2 hormones, involved in glucose metabolism: insulin and adiponectin. This targeted study show the power of the method for the determination of the effects of a great number of varied contaminants: pesticides, OP and OC, PCB. The results show that all of the 268 samples of cord blood serum have high levels of PCB 153 (> 0.110µg/L). It also appears that this particular PCB involves a reduction of 28% of the insulin rate at birth, according to the concentration. p,p'-DDE shows a strong influence on the insulin and adiponectin levels with weak concentrations, ranging from 0.1 to 0.29 µg/L. Regarding to OP pesticides, insulin level at birth is influenced by urinary levels of DAP at the beginning of the pregnancy.

Beyond the acute toxicity of all chemical agents studied in these publications, the metabolomic approach showed other effects induced by these molecules which are endocrine disruptors. These proven effects on glucose and lipids metabolism induce the authors to involve these chemical agents in the incidence of type 2 diabetes and obesity.

Lexique

Acide cinnamique : composé organique des plantes de la famille des phénylpropanoïdes et précurseur des flavonoides
Correction de Bonferroni : méthode d'analyse statistique qui permet de se prémunir contre l'augmentation du risque de rejeter une hypothèse à tort lors de tests multiples, le principe consistant à réaliser les tests avec un seuil de signification plus petit que 5% et de choisir cette valeur de telle sorte qu'après inflation due aux comparaisons multiples, le niveau global atteint soit de 5%.
Cohorte PELAGIE : Étude Longitudinale portant sur les Anomalies de la Grossesse, l'Infertilité et l'Enfance, réalisée en Bretagne de 2002 à 2006.
Elisa : Dosage immuno-enzymatique sur support solide.
Flavonoïde : famille de métabolites secondaires de plantes, classée parmi les polyphenol dérivés du noyau flavone
GC-HRMS : chromatographie gazeuse couplée à un détecteur de spectrométrie de masse haute résolution.
Immuno-radiométrique : dosage spécifique sans compétition par anticorps marqués.
Lipides complexes : hétérolipides contenant des groupes phosphate, sulfate ou glucidique, sur une base de glycérol, sphingosine, choline, sérine estérifiés par des acides gras longs.
LC-MS/MS : Chromatographie liquide couplée à un détecteur de spectrométrie de masse.
Masse mono-isotopique : masse d'une molécule calculée à partir des isotopes les plus abondants.
Métabolomique : étude de l'ensemble des métabolites formant le métabolome, et présents dans un organite, une cellule, un tissu, un organe ou un organisme.
Organochlorés : molécules organiques renfermant au moins une liaison carbone-chlore, pour les pesticides ce sont généralement des insecticides ou fongicides
Organophosphorés : molécules organiques ayant au moins une liaison carbone-phosphore, pour les pesticides ce sont généralement des insecticides ou herbicide.
Perturbateur endocrinien : molécule qui mime, inhibe ou modifie l'action d'une hormone et perturbe le développement et/ou le fonctionnement endocrinien normal d'un organisme.
Polluants organiques persistants : molécules qui résistent aux dégradations, qui s'accumulent dans les tissus des organismes vivants et présentent des effets nuisibles sur la santé humaine et l'environnement.
Polychlorobiphényles : composés aromatiques organochlorés dérivés du biphényle.
SIM (Selected Ion Monitoring): analyseur de masse paramétré pour ne détecter qu'un ion choisi.
SPE (Solid Phase Extraction) : méthode de préparation de l'échantillon permettant de séparer les éléments d'un mélange par adsorption sélective.
Syndrome métabolique : troubles d'origine glucidique, lipidique ou vasculaire, associés à une surcharge pondérale, et qui vont provoquer un diabète de type 2 et prédisposer à l'athérosclérose.
UPLC-HRMS : chromatographie liquide ultra-haute performance couplée à un détecteur de spectrométrie de masse haute résolution.

Publications de référence

1 Starling AP, Umbach DM., et al. Pesticide use and incident diabetes among wives of farmers in the Agricultural Health Study. *Occup Environ Med* 2014;0:1-7.

2 Slotkin TA. Does early-life exposure to organophosphate insecticides lead to prediabetes and obesity? *Reprod Toxicol* 2011;31(3):297-301.

3 Floegel A, Stefan N, et al. Identification of serum metabolites associated with risk of type 2 diabetes using a targeted metabolomic approach. *Diabetes* 2013;62:639-648.

4 Ganna A, Salihovic S, et al. Large-scale metabolomic profiling identifies novel biomarkers for incident coronary heart disease. *PLoS Genet* 2014;10(12):1-10.

5 Floegel A, Drogan D, et al. Reliability of serum metabolite cpncentrations over a 4-month period using a targeted metabolomic approach. *PLoS One* 2011;6(6):1-10.

6 Kleberg K, Nielsen LL, et al. Evaluation of the immediate vascular stability of lipoprotein lipase-generated 2-monoacylglycerol in mice. *Biofactors* 2014;40(6):596-602.

7 Wu H, Bertrand KA, et al. Persistent organic polluants and type 2 diabetes: a prospective analysis in the nurses' health study and meta analysis. *Environ Health Perspect* 2013;**121**(2):153-161.

8 Casas M, Nieuwenhuijsen M, et al. Prenatal exposure to PCB-153, p,p'-DDE and birth outcomes in 9000 mother–child pairs: exposure-response relationship and effect modifiers. *Environ Int* 2015;74**:**23-31.

9 Valvi D, Mendez MA, et al**.** Prenatal concentrations of polychlorinated biphenyls, DDE, and DDT and overweight in children: a prospective birth cohort study. *Environ Health Perspec* 2012;120(3)451-457.

10 Martos-Moreno GA, Barrios V, et al. Influence of prematurity and growth restriction on the adipokine profile, IGF1, and ghrelin levels in cord blood: relation-ship with glucose metabolism. *Eur J Endocrino* 2009;161:381-389.

11 La Merrill M, Karey E, et al. Perinatal exposure of mice to the pesticide DDT impairs energy expenditure and metabolism in adult female offspring. *PLoS One* 2014;9(7):1-11.

12 Lasram MM, Dhouib IB, et al. A review on the molecular mechanisms involved in insulin resistance induced by organophosphorus pesticides. *Toxicology* 2014;322:1-13.

Revues de la littérature

Evangelou E, Ntritsos G, et al. Exposure to pesticides and diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Environ Int* 2016;**91**:60-68.

Dhouib IB, Annabi A, et al**.** Carbamates pesticides induced immunotoxicity and carcinogenicity in human: A review. *J Appl Biomed* 2016;14:85-90.

Athersuch T. Metabolome analyses in exposome studies: Profiling methods for a vast chemical space. *Arch Biochem Biophys* 2016;586:177-186.

Autres publications identifiées

Meng G, Feng Y, et al. Internal exposure levels of typical POPs and their associations with childhood asthma in Shanghai, China. *Environ Res 2016;*146:125-135
Cette publication présente les mesures d'exposition pour un large panel de pesticides (OC, OP, POP, PCB) et le lien avec le développement d'asthme chez l'enfant. La publication n'a pas été retenue car l'identification des signaux cellulaires n'est pas réalisée.

Quijano L, Yus V, et al. Chronic cumulative risk assessment of the exposure to organophosphorus, carbamate and pyrethroid and pyrethrin pesticides through fruit and vegetables consumption in the region of Valencia (Spain). *Food Chem Toxicol* 2016; 89:39-46.
Cette publication présente le suivi de 84 pesticides par différentes techniques analytiques afin d'estimer l'effet cumulatif. La publication n'a pas été retenue car aucun lien n'est établi entre cet effet cumulatif et un risque sur la santé.

Butler-Dawson J, Galvin K, et al**.** Organophosphorus pesticide exposure and neurobehavioral performance in Latino children living in an orchard community. *NeuroToxicology* 2016; 53:165-172.
La publication présente l'évaluation de l'exposition aux OP par le dosage de résidus a lieu d'habitation. Un lien est établi entre cette exposition et la diminution des performances d'apprentissage des enfants. La publication n'a pas été retenue car l'approche métabolomique n'est pas envisagée.

Liens d'intérêts :

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

anses
agence nationale de sécurité sanitaire
alimentation, environnement, travail

Connaître, évaluer, protéger

Bulletin de veille scientifique

Édition scientifique • Bulletin de veille n° 31 • Mars 2017
Notes d'actualité scientifique

Agents biologiques

Impact sur le neurodéveloppement de l'infection *in utero* par le virus Zika

Laetitia DAVIDOVIC | **davidovic@ipmc.cnrs.fr**

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

Mots clés : **Agent infectieux, facteur de risque, infection virale, microcéphalie, neurodéveloppement, progéniteur neural, Zika**

Le cerveau est un organe extraordinairement complexe dont le développement peut être impacté par les agents biologiques infectieux (virus, bactéries) ou chimiques présents dans l'environnement(1). Le cerveau est particulièrement vulnérable pendant la période embryonnaire, et l'exposition de la mère à des agents infectieux pendant la grossesse est un facteur de risque* avéré pour de nombreux troubles du neurodéveloppement*(2). Ces troubles conduisent à des anomalies structurales et fonctionnelles du cerveau qui se traduisent plus tard par des déficits du comportement et des facultés cognitives.
L'Organisation Mondiale de la Santé a reconnu au début 2015 l'infection par le flavivirus émergent Zika* comme un enjeu de santé publique majeur (3). Si l'infection est asymptomatique dans la majorité des cas, 20% des personnes infectées développent de la fièvre et des éruptions cutanées et dans une fraction infime des cas, des troubles neurologiques sévères (4). Au Brésil, pays touché par l'épidémie actuelle, l'importante hausse d'incidence de microcéphalie*et l'anomalie de la taille du cerveau de nouveau-nés (5), conduit à suspecter un lien entre l'infection de la mère par le virus Zika et le constat de microcéphalies. Les publications présentées établissent le lien entre Zika et la microcéphalie et éclairent sur des mécanismes impliqués.

Etude rétrospective sur l'association entre le virus Zika et la microcéphalie en Polynésie française

Cauchemez S. et al. **(**2016). Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013-15: a retrospective study. The Lancet, vol. 387: p. 2125-2132.

Résumé

Cette publication présente l'analyse rétrospective d'une épidémie d'infections à virus Zika qui a touché la Polynésie Française d'octobre 2013 à avril 2014. Les auteurs ont estimé la probabilité d'infection de la population générale et des femmes enceintes par le virus Zika pour chaque semaine de l'épidémie, en se basant sur des données sérologiques d'exposition au virus obtenues par un dosage ELISA* d'anticorps* reconnaissant le virus Zika, sur 3 échantillons issus de sérothèque (pré-épidémie, pendant l'épidémie et post-épidémie). Ces données montrent que 66% de la population générale a été infectée pendant l'épidémie ($IC_{95\%}$= [62-70]) contre 1% avant l'épidémie. Ces analyses ont été croisées avec les nombres de consultations pour suspicion d'infection à Zika. En parallèle, une recherche exhaustive menée sur les dossiers médicaux a permis d'identifier tous les cas de microcéphalie diagnostiqués entre septembre 2013 et juillet 2015 (n=8), dont 88% (n=7) ont eu lieu dans la période de fin de l'épidémie.

Les chercheurs ont ensuite développé six modèles mathématiques pour identifier le ou les trimestres de grossesse les plus à risque de microcéphalie lié à l'infection par Zika. Cette modélisation a permis de montrer que la période de risque maximal est le 1er trimestre de grossesse. En effet, le modèle prenant en compte le 1er trimestre de gestation comme période de risque est celui qui présente le meilleur ajustement (« fit ») avec les données cliniques indiquant une prévalence de base de microcéphalie de 2 cas pour 10 000 nouveau-nés. Le risque calculé de microcéphalie associée à l'infection par le virus Zika est alors de 95 pour 10 000 femmes infectées dans le premier trimestre de grossesse ($IC_{95\%}$= [34-191]) correspondant à un facteur de risque de 53,4 ($IC_{95\%}$ = [6,5-1061]).

Commentaire

Le résultat majeur de cette publication est d'établir un lien statistique d'association fort entre la microcéphalie et l'infection gestationnelle par Zika, et de conclure sur le fait qu'une femme infectée par ce virus pendant le 1er trimestre de grossesse a 50 fois plus de chances d'avoir un enfant microcéphale qu'une femme non infectée par Zika. Ce risque d'anomalie du neurodéveloppement est relativement faible par rapport à d'autres types d'infections virales comme la rubéole qui s'accompagne dans plus d'un cas sur trois d'anomalies neurologiques (6). Cependant, au vu du taux élevé d'infection par Zika (estimé à 66% pendant la période épidémique), cela pose un sérieux problème de santé publique.

La limitation principale de cette étude est liée au faible nombre de cas de microcéphalie (n=8) en raison de la population limitée en Polynésie. Pour conforter ces résultats et lorsque les données seront disponibles, des études épidémiologiques rétrospectives sur des populations plus nombreuses (cf au Brésil) devront être menées pour valider les modèles décrits dans cette publication. D'autre part, le risque de conséquences neurologiques délétères sur le fœtus est vraisemblablement sous-estimé par la seule inclusion des cas de microcéphalie excluant d'autres malformations cérébrales détectées *in utero* ou à la naissance et qui pourraient cependant être liées à l'infection par Zika. Des études complémentaires sont nécessaires pour comprendre l'éventail des troubles du neurodéveloppement liés à l'exposition *in utero* au virus Zika.

Le virus Zika infecte les progéniteurs neuraux corticaux humains et réduit leur prolifération

Tang H. et al. (2016). Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates Their Growth. Cell Stem Cell, vol.18: p 1-4.

Résumé

Cette publication contribue à identifier les cellules du cerveau foetal ciblées par le virus Zika en utilisant un modèle de cellules souches pluripotentes humaines (CSPi)* et différenciées en progéniteurs neuraux* et en neurones immatures. Cette étude montre que le virus Zika n'infecte que 15 à 20% des CSPi ou neurones immatures. Par contre, Zika infecte très efficacement 90% des progéniteurs neuraux dans lesquels il est capable de se répliquer. L'infection des progéniteurs neuraux par le virus se traduit par une augmentation de leur mortalité due à une dérégulation générale de leur capacité à proliférer et à une augmentation de l'apoptose*. Pour compléter ces données, une analyse globale du transcriptome* des progéniteurs neuraux infectés par Zika révèle une altération importante de l'expression de certains gènes, dont ceux identifiés pour des voies de signalisation liées au cycle cellulaire et d'activation de mort cellulaire programmée (apoptose). Cela souligne que l'infection par Zika peut perturber la neurogenèse* *in vitro*.

Commentaire

Il était connu que le virus Zika est détectable dans le liquide amniotique de femmes infectées et également dans le cerveau fœtal (7,8), cependant l'identité des cellules du cerveau ciblées par Zika restait encore méconnue. Cette étude montre que, bien que les flavivirus soient connus pour avoir un tropisme cellulaire important, certaines sous-populations de cellules comme les progéniteurs neuraux sont plus sensibles à l'infection. Le développement de ce modèle *in vitro* basé sur des CSPi ouvre la voie à des études plus complètes pour modéliser l'impact neural de l'infection par Zika, élucider les mécanismes moléculaires et cellulaires conduisant à la microcéphalie et ouvre des perspectives de criblage de molécules thérapeutiques candidates. L'infection par Zika réduirait le nombre de progéniteurs neuraux disponibles pour structurer le cerveau en cours de développement et contribuerait ainsi à une réduction du volume du cerveau, conduisant à la microcéphalie observée chez les nouveau-nés exposés *in utero* au virus.

Néanmoins, comme cette étude repose sur un modèle *in vitro,* il reste nécessaire de valider ces observations dans des modèles animaux. Des études chez la souris (9, 10), ont récemment déterminé l'impact de l'infection par Zika sur les progéniteurs neuraux du cerveau en développement. Il serait maintenant important de vérifier les capacités de Zika à infecter d'autres types cellulaires du cerveau comme les cellules gliales qui jouent un rôle essentiel dans le support et la migration des neurones en développement.

Conclusion générale

L'étude rétrospective épidémiologique établit un lien fort entre « exposition à Zika pendant le 1er trimestre de grossesse » et « microcéphalie », confirmant ainsi que l'infection virale in utero est un facteur de risque de malformation cérébrale. L'étude réalisée dans un modèle cellulaire précise les mécanismes cellulaires et moléculaires pouvant contribuer à la microcéphalie chez le foetus infecté par le virus Zika.

Ces travaux précisent la fenêtre développementale de vulnérabilité à l'infection par Zika du cerveau fœtal en l'orientant vers le 1er trimestre de gestation. Il est connu que le stock de progéniteurs neuraux du cerveau foetal se constitue majoritairement durant le 1er trimestre de gestation (11) et la publication de Tang et al. révèle qu'il s'agit précisément de cette population cellulaire qui est ciblée par le virus. Pour expliquer ce tropisme, un article récent semble montrer que le récepteur AXL des progéniteurs est utilisé pour la reconnaissance du virus (12).

L'infection maternelle durant la grossesse est un facteur de prédisposition pour de nombreuses maladies mentales ayant une origine neurodéveloppementale, telles que l'autisme ou la schizophrénie (2). Il serait important de déterminer si l'exposition à Zika in utero est associée à un risque accru de développer plus tard ces pathologies. Ces résultats peuvent déjà être utilisés pour appuyer les campagnes de sensibilisation des populations exposées à des agents infectieux tels que Zika aux risques encourus par le fœtus. Cela souligne également la nécessité de mettre en place des mesures préventives pour éradiquer la présence du moustique-vecteur dans les zones touchées et empêcher sa propagation.

GENERAL CONCLUSION

The retrospective epidemiological study establishes a strong link between gestational exposure to Zika during the 1st trimester of pregnancy and microcephaly, confirming that in utero viral infection is a risk factor for brain malformation. The study in cellular model highlights the cellular and molecular mechanisms that may contribute to microcephaly in fetus infected with Zika virus. These studies identify the developmental window of vulnerability to Zika infection for the fetal brain, pointing out the first trimester. The stock of neural progenitors of the fetal brain is mainly constituted during the 1st trimester of pregnancy (11) and the publication of Tang et al. reveals that this cell population is specifically targeted by the virus. To explain this tropism, a recent paper suggests that the AXL receptor expressed in neural progenitors is used for the recognition of the virus (12). Maternal infection during pregnancy is a risk factor for several mental disorders of neurodevelopmental origin, such as autism or schizophrenia (2). It will be important to determine whether exposure to Zika in utero is associated with an increased risk of later developing these diseases. Yet, these studies can be used to support sensitization campaigns to fetal risks in populations exposed to infectious agents such as Zika. It also stresses the need to implement preventive measures to eradicate the presence of the mosquito vector in the affected areas and prevent the spreading of the virus.

Lexique

Anticorps : protéine produite par le système immunitaire pour détecter et neutraliser les agents pathogènes de manière spécifique.
Apoptose : processus par lequel des cellules déclenchent leur auto-destruction en réponse à un signal, aussi appelée mort cellulaire programmée.
Cellules souches pluripotentes induites (CSPi): cellules obtenues à partir de cellules somatiques adultes, qui redeviennent capables de se différencier en n'importe quel type cellulaire de l'organisme, après traitement adapté en laboratoire. Elles diffèrent des cellules souches embryonnaires (CSE) qui se différencient naturellement en conditions physiologiques.
ELISA : test basé sur une méthode immuno-enzymatique de dosage, utilisé notamment pour détecter dans un échantillon sanguin, la présence d'anticorps spécifiques d'un agent infectieux.
Facteur de risque : tout attribut, caractéristique ou exposition d'un sujet qui augmente la probabilité de développer une maladie ou de souffrir d'un traumatisme.
Neurogenèse : ensemble du processus de création d'un neurone fonctionnel à partir d'un progéniteur neural. Elle a principalement lieu lors du développement neuronal du cerveau chez l'embryon et l'enfant mais également dans des régions discrètes du cerveau adulte
Microcéphalie : anomalie neurologique définie par une circonférence de la tête inférieure à la normale d'au moins 2 écart-types. Cette anomalie est associée à une réduction du volume cérébral et accompagnée de déficience intellectuelle, problèmes moteurs et troubles du langage et du comportement.
Progéniteur neural : cellule souches multipotentes capables d'auto-renouvellement dont le potentiel de différenciation est restreint aux types cellulaires neuraux: neurone et cellules gliales (astrocyte, glie radiaire et oligodendrocyte).
Transcriptome : l'ensemble des ARN issus de la transcription du génome. Le transcriptome reflète l'expression des gènes à un instant donné, celui de la préparation de l'échantillon.
Troubles du neurodéveloppement : anomalies du développement du système nerveux ayant lieu pendant la période embryonnaire et jusqu'à la petite enfance conduisant à des altérations structurales et fonctionnelles du cerveau.
Zika : virus de la famille des Flaviviridae transmis par le moustique Aedes aegypti communément présent dans les Amériques tropicales et subtropicales, responsable de l'épidémie de fièvre Zika.

Publications de référence

2 Patterson PH Immune involvement in schizophrenia and autism: etiology, pathology and animal models. *Behav Brain Res* 2009; **204**:313-321.

3 WHO Zika situation report. http://www.who.int/ emergencies/zika-virus/situation-report/19-february-2016/en/.

5 Passemard S, Kaindl AM, Verloes A Microcephaly. *Handb Clin Neurol* 2013; **111**:129-141.

6 De Santis M, Cavaliere AF,et al**.**Rubella infection in pregnancy.*Reprod Toxicol* 2006 **21**:390-398.

11 Levitt P Structural and functional maturation of the developing primate brain.*J Pediatr* 2003; **143**: S35-45.

Revues de la littérature

1 Rauh VA, Margolis AE Environmental exposures, neurodevelopment, and child mental health - new paradigms for the study of brain and behavioral effects. *J Child Psychol Psychiatry* 2016; 57:775-793.

4 Shuaib W, Stanazai H, et al. The reemergence of Zika virus: a review on pathogenesis, clinical manifestations, diagnosis, and treatment. *Am J Med* 2016; 129: 7-12

Autres publications identifiées

7 Calvet G, Aguiar RS, et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *Lancet Infect Dis* 2016; 16:653-660.
Cet article montre la présence du virus Zika dans les tissus de fœtus présentant une microcéphalie, ce qui indique que le virus est capable d'infecter le foetus.

8 Mlakar J, Korva M, et al. Zika Virus Associated with Microcephaly. *N Engl J Med* 2016; 374: 951-958.
Cet article montre la présence de virus Zika dans le liquide amniotique de fœtus présentant une microcéphalie, montrant que le virus est capable de passer la barrière placentaire.

9 Cugola FR, Fernandes IR, et al. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental model. *Nature* 2016; 534:267-271.
Cet article montre que Zika traverse le placenta chez la souris, cause la microcéphalie et cible les progéniteurs neuraux du cortex. De plus, l'infection par Zika de cultures organoïdes de cerveau humain conduit à une réduction des zones de prolifération et une désorganisation des couches corticales.

10 Li C, Xu D, et al. Zika Virus Disrupts Neural Progenitor Development and Leads to Microcephaly in Mice. *Cell Stem Cell* 2016; 19:120-126.
Cet article montre que Zika se réplique efficacement dans le cerveau embryonnaire de la souris et inhibe la prolifération des progéniteurs neuraux, ce qui conduit à un amincissement du cortex cérébral et à la microcéphalie.

12 Nowakowski TJ, Pollen AA, et al. Expression Analysis Highlights AXL as a Candidate Zika Virus Entry Receptor in Neural Stem Cells. *Cell Stem Cell* 2016; in press.
Cette article identifie la protéine AXL comme possible récepteur pour la reconnaissance et l'entrée du virus Zika dans les cellules progénitrices neurales.

Liens d'intérêts :

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

Utilisation des phylogénies d'infections en épidémiologie

Samuel ALIZON et Emma SAULNIER | **samuel.alizon@cnrs.fr**

CNRS - Laboratoire Mivegec (UMR CNRS, IRD, UM 5290) - Montpellier

Mots clés : **Bactérie, épidémiologie, évolution, infection, mutation, phylodynamique, séquençage, virus**

Les virus évoluent rapidement. Ceci explique en partie les difficultés à mettre au point des vaccins ou des traitements (1). L'évolution est dite « neutre » quand les mutations génétiques n'affectent pas les traits de l'infection. La phylodynamique propose d'utiliser cette évolution neutre afin d'inférer des paramètres épidémiologiques (2,3). Il s'agit d'étudier la manière dont les virus se propagent, ce qui laisserait des traces dans leur génome. À la base de cette discipline, il y a le parallèle entre une phylogénie d'infection (représentation de l'évolution du virus au cours d'une épidémie) et une chaîne de transmission. En effet, chaque embranchement dans la phylogénie peut être vu comme une transmission et chaque feuille comme une fin d'infection. Ceci a conduit les biologistes de l'évolution à appliquer des modèles phylogénétiques au cas des phylogénies d'infections, par exemple pour approximer la prévalence des infections (4). Ces dernières années ont vu des progrès dans le développement de modèles statistiques permettant d'inférer des paramètres tels que le taux de reproduction de base (ou R_0), qui caractérise la vitesse de propagation d'un pathogène. Ces méthodes ont en commun de reposer sur des modèles mathématiques qui calculent la probabilité d'observer une phylogénie pour un modèle sous-jacent donné et un jeu de paramètres donné (5,6). Des approches dites de phylogéographie permettent aussi de retracer la propagation d'épidémies dans l'espace, par exemple la grippe aviaire en Asie (7). Enfin, de nouvelles approches visent à maximiser la précision des modèles en combinant des données d'épidémiologie « classiques » (prévalence) et données génétiques (8). Les trois publications illustrent l'apport de la phylodynamique pour l'étude d'infections émergentes (Zika), sa faisabilité dans un contexte difficile (Ebola en Afrique de l'Ouest) et les défis soulevés par l'accumulation de séquences (le cas du virus du syndrome respiratoire et reproductif porcin).

Le virus Zika dans les Amériques : premiers résultats épidémiologiques et génétiques

Faria NR. et al. (2016). Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. Science, vol. 352: p.345-9.

Résumé

Le virus Zika appartient au genre des Flavivirus (comme la dengue). Il est généralement transmis à l'homme par un moustique du genre *Aedes* et peut causer des symptômes modérés (maux de tête, courbatures) et avoir des conséquences graves chez le foetus. Zika a été découvert en 1947 en Ouganda. On en connaît deux génotypes (africain et asiatique). Entre 2007 et 2014, Zika a causé plusieurs épidémies dans le Pacifique. En mai 2015, il a été détecté au Brésil et, fin janvier 2016, 30.000 cas avaient été recensés (ce chiffre sous-estime fortement l'incidence car la majorité des cas sont asymptomatiques).

Afin d'en savoir plus sur l'origine de l'épidémie, les auteurs ont séquencé le génome complet de Zika chez sept individus. Ces sept séquences étaient peu différentes des séquences existantes. En inférant un arbre phylogénétique daté à partir de ces sept séquences et de 16 autres disponibles dans la base de données de référence, ils ont constaté que les séquences d'Amérique du Sud appartenaient au génotype asiatique et partageaient un ancêtre commun avec la souche de 2013 en provenance de Polynésie française. De plus, les séquences du Brésil sont éparpillées dans le groupe des séquences américaines, suggérant une propagation du Zika entre les pays. Toutefois, comme le Zika a d'abord été identifié au Brésil et, comme sa diversité génétique y est la plus élevée, les auteurs pensent que c'est là que l'épidémie Sud-Américaine a commencé.

Enfin, selon les auteurs, l'ancêtre commun aux séquences américaines se situerait entre août 2013 et avril 2014. Celui des séquences américaines et de Polynésie française remonterait à une date entre décembre 2012 et septembre 2013. Ceci suggère que le virus n'a pas été introduit au Brésil pendant la coupe du monde de football (été 2014) mais peut-être pendant la coupe des confédérations en 2013. Enfin, les répercussions des mutations de la souche Brésilienne de Zika sur les propriétés physico-chimiques des protéines du virus ne semblent pas avoir d'impact sur la transmission de ce dernier.

Commentaire

Cet article montre que la phylodynamique est maintenant utilisée en routine pour analyser une « flambée épidémique ». L'analyse de quelques génomes permet d'en savoir plus sur l'origine de l'épidémie, en particulier dans le cas d'un pathogène mal connu. Ces méthodes permettent aussi de dater les événements, par exemple l'arrivée de Zika au Brésil. Le peu de séquences utilisées ici fait que l'incertitude autour des dates estimées est grande. C'est d'ailleurs une des limites de cette étude, surtout à l'heure où le séquençage est devenu facile même en conditions extrêmes comme l'illustre la seconde étude.

Séquençage portable des génomes en temps réel pour la surveillance d'Ebola

Quick J. et al. (2016)**.** Real-time, portable genome sequencing for Ebola surveillance. Nature, vol. 530: p.228-32.

Résumé

Le MinION est un système de séquençage très léger, et connectable sur ordinateur portable. Cette nouvelle technologie permet de séquencer rapidement de grandes séquences d'ADN (>50 kb). Les auteurs décrivent un protocole de séquençage et d'analyse de séquences rapide, basé sur la technologie MinION. Pour prouver sa praticité, ils l'ont utilisé pendant l'épidémie d'Ebola en Afrique de l'ouest. Au préalable, ils ont validé leur approche en la comparant au séquençage Illumina classique. Ils ont ensuite expédié l'ensemble de leur système en Guinée. En six mois, ils ont obtenu 142 séquences complètes sur 148 protocoles de séquençage par MinION. Celles-ci ont été combinées à 603 autres séquences d'Ebola récoltées depuis le début de l'épidémie en 2014 pour inférer un arbre phylogénétique daté avec le logiciel BEAST (*Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees*). Dès les 10 premiers jours de séquençage, ils ont identifié que les souches persistantes en Guinée appartenaient à deux principales lignées établies dès le début de l'épidémie : GN1 qui est largement restée confinée en Guinée et SL3 qui a d'abord été détectée en Sierra Leone puis en Guinée vers la fin 2014. Grâce à leur jeu de données combinées, ils ont pu constater que GN1 et SL3 ont été toutes les deux détectées en Sierra Leone, début 2015. Ceci suggère qu'il y a eu des transmissions entre les deux pays.

Commentaire

Cet article illustre la faisabilité des approches de phylodynamique. Même dans le cas d'un parasite extrêmement virulent sévissant dans des régions du monde particulièrement mal équipées, les techniques modernes permettent de séquencer des génomes entiers en temps réel. Toutefois, au-delà de ce « tour de force », les résultats biologiques décrits sont limités. En effet, ils apportent peu de nouveaux éléments par rapport aux études existantes sur l'origine et même sur la propagation de l'épidémie d'Ebola.

De plus, du fait qu'il séquence des molécules uniques d'ADN, le MinION est reconnu pour avoir un taux d'erreur non négligeable (de 10 à 20 %). Pour palier à ce défaut, les auteurs ont donc effectué plusieurs lectures des séquences (au moins 25 fois dans l'étude).

Méthodes phylodynamiques dans une épidémie récente du virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin

Alkhamis MA. et al. (2016)**.** Applications of Bayesian Phylodynamic Methods in a Recent U.S. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Outbreak. Front Microbiol, vol.7 : p.67-77

Résumé

Le syndrome respiratoire et reproductif porcin (PRRS), endémique aux États-Unis, est causé par le virus du PRRS (PRRSV), qui se transmet très rapidement. L'épidémie de PRRSV est difficile à contrôler et de nouvelles souches de ce virus émergent, classées par des marqueurs RFLP (*Restriction Length Fragment Polymorphism*). Cette étude utilise des modèles phylodynamiques pour caractériser la propagation d'une souche virulente du PRRSV entre 2014 et 2015 aux États-Unis afin d'orienter les mesures de contrôle. Les auteurs ont obtenu 6774 séquences ADN d'une protéine du PRRSV, échantillonnées entre Janvier 1998 et Avril 2015 à partir de cinq lieux de production porcine indépendants (identifiés A, B, C D et E) et qui pratiquent 3 types d'élevage (truies en naissance-sevrage, truies en naissance-engraissement, et cochons).

Une première analyse phylogénétique de l'ensemble des séquences leur a permis d'identifier un groupe de 288 séquences phylogénétiquement proches (majoritairement du type RFLP 1-7-4), échantillonnées entre Septembre 2003 et Mars 2015. Ce groupe a fait l'objet d'analyses épidémiologiques plus approfondies par le logiciel BEAST (*Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees*). Les auteurs ont ainsi constaté que le nombre de porcs infectés par le PRRSV de type RFLP 1-7-4 était en rapide expansion. Ils ont également estimé que l'ancêtre commun de ce groupe de séquences remonte à Septembre 1996, date qui coïncide avec celle de l'ancêtre commun des séquences provenant du lieu C. D'autres analyses sur la dispersion du virus ont permis d'identifier le lieu C comme unique source des épidémies dans les lieux A, B, D et E. Selon l'étude, la dispersion depuis le lieu C aurait commencé en Septembre 2000. Enfin, en croisant la phylogénie avec les types d'élevage et lieu des localisations, les auteurs ont estimé que le pathogène circule uniquement depuis les fermes de truies vers les autres fermes et que l'épidémie aurait débuté dans les fermes de truies en Septembre 1999.

Commentaire

L'article illustre la quantité de données analysables (des milliers de séquences et des données de localisation) mais aussi les limites des méthodes actuelles. Car, pour identifier les routes de dispersion du virus, les auteurs n'ont pu garder que 4 % des séquences. Quel serait l'impact des 96% restants ? De plus, les données n'ont été obtenues qu'à partir d'éleveurs volontaires, ce qui peut biaiser les résultats. Enfin, l'article illustre l'importance d'avoir une bonne connaissance du sujet d'étude afin de bien calibrer les modèles (par exemple les types d'élevages)

Conclusion générale

Les avancées de séquençage sont en train de bouleverser l'épidémiologie. Comme les épidémies récentes d'Ebola et de Zika l'illustrent, il est possible d'avoir une couverture quasi-exhaustive de la diversité génétique des virus en temps réel. Les approches de phylodynamique permettent alors d'en savoir plus sur la propagation et la biologie des infections (taux de transmission, durée d'infection, origine géographique) et d'ajuster en temps réel les mesures de santé publique (campagnes de sensibilisation, dépistage et traitement, quarantaines). Ces approches sont, en effet, moins sensibles aux biais d'échantillonnage que les approches classiques. Deux défis méthodologiques se posent alors : d'une part, combiner plusieurs types de données (séquences, dates, prévalences, localisations), et d'autre part, utiliser de grands jeux de données, les approches actuelles fonctionnant essentiellement pour des modèles simples et des phylogénies limitées.

General conclusion

Progresses in sequencing are revolutionizing epidemiol-ogy. As illustrated by the recent Ebola and Zika outbreaks, it is now possible to get a good coverage of the virus genetic diversity in real-time. Phylodynamic approaches then provide information on the spread and the biology of infections (transmission rate, infection duration, geographical origin) and enable to adjust the public health measures (awareness, screening and treatment campaigns, quarantines) in real time. Indeed, those approaches are less sensitive to sampling bias than classical approaches. Two methodological challenges remain open: first, being able to combine several types of data (sequences, dates, prevalences, locations), and, second, using large datasets since current methods only work for simple models and small phylogenies (a few hundred leaves).

Lexique

Ancêtre commun : En phylogénie, l'ancêtre commun d'un groupe d'individus est l'individu le plus proche en remontant dans le temps, et dont descendent tous les individus en question. En épidémiologie, on parle aussi de « patient zéro ».
BEAST (*Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees*) : logiciel d'analyse bayésienne d'arbres phylogénétique qui permet d'effectuer des analyses phylodynamiques.
Diversité génétique : degré de variété des séquences au sein d'une même espèce.
Phylogénie : Arbre qui représente la distance et la relation de parenté entre des individus (typiquement représentés par des séquences génétiques ou protéiques). Chaque feuille de l'arbre correspond à une séquence et chaque nœud d'embranchement à l'ancêtre commun des feuilles qui lui succèdent.
Phylogéographie : approche consistant à combiner données de séquences, date de prélèvement et lieu de prélèvement afin d'inférer l'histoire de propagation d'un organisme.
R_0 : taux de reproduction de base.
RLFP (*Restriction Length Fragment Polymorphism*) : polymorphisme de longueurs de fragments de restriction, parfois utilisé pour caractériser la souche d'un pathogène. Le génome d'un pathogène peut être coupé en fragments par une enzyme de restriction (protéine). Le profil des découpes peut varier d'un génome à un autre et peut donc être utilisé pour reconnaître un groupe de pathogènes appartenant à une même souche.

Publications de référence

1 Alizon S. C'est grave Dr Darwin ? L'évolution, les microbes et nous. 2016 Le Seuil, Paris.

2 Grenfell B. T, Pybus O G, et al. Unifying the epidemiological and evolutionary dynamics of pathogens.Science 2004; 303: 327-332.

3 Volz EM, Koelle K, Bedford T. Viral phylodynamics. PLoS Comput Biol 2013; 9

4 Pybus OG, Charleston M A, et al.The epidemic behavior of the hepatitis C virus.Science 2001; 292:2323–2325.

5 Volz EM, Kosakovsky Pond S L, et al. Phylodynamics of infectious disease epidemics. Genetics 2009; 183: 1421–1430.

6 Stadler T, Kühnert D, Bonhoeffer S, Drummond A J. Birth-death skyline plot reveals temporal changes of epidemic spread in HIV and hepatitis C virus (HCV). Proc Natl Acad Sci USA2013; 110: 228–233.

7 Lemey P, Rambaut A, Drummond A J, Suchard M A. Bayesian phylogeography finds its roots. PLoS Comput Biol 2009; 5

8 Rasmussen DA, Boni M F, Koelle K. Reconciling phylodynamics with epidemiology: the case of dengue virus in southern Vietnam. Mol Biol Evol 2014;31 :258–271.

Revues de la littérature

Frost S, Pybus O, et al.Eight challenges in phylodynamic inference. *Epidemics*2015;10:88-82.

Du Plessis L, Stadler T. Getting to the root of epidemic spread with phylodynamic analysis of genomic data. Trends Microbiol 2015;23(7):383-386.

Autres publications identifiées

Villabona-Arenas C J, de Oliveira J L, et al. Epidemiological dynamics of an urban Dengue 4 outbreak in São Paulo, Brazil. Peer J. 2016;4
Cet article relate une approche phylodynamique visant à estimer le schéma de dispersion spatio-temporel du virus de

la dengue dans la ville de São Paulo, pendant l'épidémie de 2013. Les auteurs ont également estimé le taux de reproduction au cours du temps (R) grâce aux données d'incidence.

Kühnert D, Stadler T, Vaughan TG, Drummond AJ. Phylodynamics with migration: A computational framework to quantify population structure from genomic data. Mol Bio Evol 2016; sous presses.
Cet article présente une nouvelle méthode pour incorporer des processus de migration entre localités lors de l'analyse phylodynamique. Les auteurs appliquent leur nouvelle méthode au cas du virus influenza H3N2 circulant dans plusieurs pays et à celui du Virus de l'Immunodéficience Humaine circulant dans plusieurs groupes à risque.

Joy JB, McCloske RM, et al.The spread of hepatitis C virus genotype 1a in North America: a retrospective phylogenetic study. *Lancet Inf Dis* 2016; sous presses
L'origine de l'épidémie du virus de l'hépatite C aux USA demeure controversée. Cette étude apporte de nouvelles réponses à partir de données de séquences existantes en utilisant une approche phylodynamique pour dater le début de l'épidémie et retracer la dynamique du nombre d'infections.

Arafa A, El-Masry I, et al. Phylodynamics of avian influenza clade 2.2.1 H5N1 viruses in Egypt. *Virology* Journal 2016; 13:49**.**
Il s'agit d'une application récente de la phylodynamique à un jeu de données de 8 ans portant sur le virus de la grippe aviaire H5N1 en Egypte.

Bourhy H, Nakouné E, et al. Revealing the micro-scale signature of endemic zoonotic disease transmission in an african urban setting. *PloS path* 2016; *12*(4):
Cet article applique la phylodynamique à un jeu de données de 20 ans portant sur le virus de la rage chez les chiens domestiques d'Afrique centrale.

Liens d'intérêts :

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

anses
agence nationale de sécurité sanitaire
alimentation, environnement, travail

Connaître, évaluer, protéger

Bulletin de veille scientifique

Édition scientifique • Bulletin de veille n° 31 • Mars 2017
Notes d'actualité scientifique

Qualité des milieux

Dynamique de transmission et facteurs de risque de la tuberculose à *Mycobacterium bovis* chez l'homme et l'animal : un problème global

Sylvain GODREUIL |**s-godreuil@chu-montpellier.fr**

CHU et université de Montpellier, Inserm - Laboratoire de bactériologie, Inserm U1058 - Montpellier

Mots clés : **Environnement, épidémiologie moléculaire, facteurs de risque, faune sauvage, *Mycobacterium bovis*, transmission interhumaine, tuberculose bovine et humaine, zoonose**

Mycobacterium bovis (MB)* est un pathogène à potentiel zoonotique* impliquant différents compartiments écologiques (animaux sauvages et domestiques, homme et environnent). Dans les pays du Sud, la tuberculose bovine (bTB)* représente un danger majeur en termes de santé publique et animal (1, 2). En effet dans ces régions, la majorité des bovins et de la population humaine vivent dans des zones communes où la maladie est répandue et peu contrôlée (2). Dans les pays du Nord, la mise en place de programmes de contrôle de la bTB comprenant la pasteurisation généralisée de lait et l'abattage systématique des bovins à risque ont considérablement diminué l'incidence de bTB dans les troupeaux ainsi que les cas de tuberculose (TB)* zoonotique chez l'homme (3). Aujourd'hui dans les pays industrialisés, la bTB n'est plus un problème de santé publique, mais reste un problème de santé animale coûteux et imparfaitement contrôlé avec d'importantes variations de prévalence dans le cheptel en fonction des pays (<0,02% en France et plus de 10% en Royaume Unis). Dans les pays du Nord, malgré ces programmes de contrôle et d'éradication de la bTB, MB continue à se propager à bas bruit au sein du cheptel bovin. Le réservoir principal de MB est l'animal infecté (bovin et faune sauvage), qui contamine les animaux sains essentiellement par transmission indirecte via la nourriture et l'eau contaminées par les excréta (fèces, urine, crachat…) des animaux malades (1,4). La connaissance d'autres facteurs de risque de contamination par MB, comme l'environnement par exemple, est un élément déterminant dans la lutte de cette zoonose. L'article de Barbier et al. montre que les matrices environnementales pourraient constituer un réservoir contaminant pour les animaux. Dans les pays industrialisés la plupart des cas de TB humaine à MB est diagnostiquée chez des patients, soit nés avant l'introduction de ces mesures de contrôle, soit provenant d'un pays de forte incidence de bTB dans lequel ces mesures ne sont pas appliquées. Les cas de transmission interhumaine de TB à MB restent rares et difficile à diagnostiquer, et nécessitent une approche combinée d'épidémiologie de terrain et moléculaire (5). L'article de Buss et al. illustre l'épidémiologie de cette pathologie chez l'homme dans les pays du Nord. Il met aussi en exergue : i) la complexité de la mise en œuvre et de l'interprétation des enquêtes épidémiologiques autour des cas de TB; ii) les difficultés à confirmer une transmission interhumaine de TB à MB, même, à l'aide du séquençage des génomes entiers* des isolats bactériens infectant.

Première détection moléculaire de *Mycobacterium bovis* dans des échantillons environnementaux au sein d'une région endémique française pour la tuberculose bovine

Barbier E. et al. (2016). First molecular detection of Mycobacterium bovis in environmental samples from a French region with endemic bovine tuberculosis. J Appl Microbiol, vol. 120 : p.1193-207

Résumé

L'objectif de cette étude était de déterminer, par une approche moléculaire, la prévalence de MB dans les matrices environnementales au sein d'une région française endémique pour la bTB. Trois techniques de PCR quantitative en temps réel (qPCR)* ont été mises au point pour détecter et quantifier les espèces du complexe *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB)* pour deux, et une, plus spécifique, dédiée à MB. Les performances de ces techniques moléculaires (qualité et quantité d'extraction d'ADN et sensibilité des qPCR) ont été optimisées et validées à partir de cultures pures de la souche vaccinale de MB du bacille de Camette-Guérin* diluée dans des échantillons de terre, de matière fécale et d'eau. Ces méthodes moléculaires ont été évaluées en les comparant à des techniques quantitatives phénotypiques bactériennes. La sensibilité de détection était située entre 2,5 10^2 et 2.5 10^3 unité formant colonie (UFC)/g d'échantillons ou UFC/100 ml d'eau. Les PCR* ont été réalisées sur 365 échantillons environnementaux dans la région d'étude endémique. Des échantillons environnementaux provenant d'autres régions indemnes de bTB ont été utilisés comme témoin négatif. Sur les 365 échantillons testés, neuf présentaient une PCR positive significative signant la présence du CMTB, et sur ces neuf échantillons, seulement trois affichaient une signature spécifique de la présence du MB. Grâce à l'optimisation de ces techniques de détections par PCR, les auteurs ont pu identifier pour la première fois la présence de MB dans les matrices environnementales d'une région endémique pour bTB. Mais la faible fréquence de détection de ce pathogène semblerait indiquer que l'environnement ne puisse constituer qu'un réservoir marginal de contamination pour les animaux.

Commentaire

Un des points forts de cette étude est d'avoir mis au point un protocole, que ce soit pour l'extraction de l'ADN ou pour les techniques de détection moléculaire, extrêmement performant en particulier sur des échantillons environnementaux reconnus comme difficile à exploiter (6,7). Bien que cette étude décrive pour la première fois la détection de MB dans des matrices environnementales, le faible nombre d'échantillons retrouvé positif, semble cependant pondérer le rôle de l'environnement dans le cycle (réservoir) de contamination zoonotique de MB (8, 9). La confirmation de détection du CMTB dans des sources d'eau où s'abreuvent les animaux d'élevage et sauvages, fait suggérer aux auteurs que ces zones pourraient être des lieux privilégiés de contamination directe ou indirecte entre les animaux infectés et sains. Il serait pertinent d'explorer l'impact de la saisonnalité (période humide *versus* période sèche) sur la fréquence et l'intensité de détection de MB dans ces zones d'eau. En effet, la diminution des ressources disponibles en eau pendant la période sèche, pourrait augmenter le risque de contamination bactérienne dans cet environnement par l'accroissement de densité des populations d'animaux contaminés venant s'abreuver à ces sources (10). L'un des points faibles de cette étude, est de ne pas avoir associé à la détection moléculaire de MB, la recherche simultanée de ce pathogène en culture. Car si la détection de MB par PCR prouve la présence d'ADN mycobactérien dans l'environnement, ceci n'exclut pas que ce dernier puisse être issu de pathogènes non viables et donc non infectants (6).

Suspicion de transmission interhumaine aéroportée à *Mycobacterium bovis* au Nebraska entre 2014 et 2015

Buss BF. et al. (2016). Possible Airborne Person-to-Person Transmission of *Mycobacterium bovis* - Nebraska 2014-2015. Morb Mortal Wkly Rep. Vol. 65: p. 197-201.

Résumé

Le but de cette étude était d'explorer les liens de transmission possibles entre deux cas de TB humaine dans le Nebraska (US) (patients A et B) à MB microbiologiquement documentés et dont le lien génétique entre les isolats a été confirmé par séquençage des génomes complets*. L'objectif secondaire était de décrire l'enquête épidémiologique autour de ces cas. Le patient A, 42 ans, né au Mexique, vivant aux État-Unis (Nebraska) depuis 2010, présentait comme facteur de risque le fait d'avoir travaillé dans une ferme laitière et de consommer régulièrement de la nourriture mexicaine à base de lait non pasteurisé. La patiente B, 16 ans, d'origine mexicaine, née aux État Unis, ne présentait aucun facteur de risque d'exposition à MB. Le seul lien entre les deux patients était de fréquenter régulièrement la même église. L'enquête autour des cas permettait de cibler 181 patients dont 24 à haut risque (avec des contacts étroits), et 157 avec un risque moins élevé parmi les familles, les collègues de travail, les élèves du lycée et les paroissiens. L'ensemble des sujets bénéficiait d'un test de dépistage de TB latente associant un test d'intradermoréaction à la tuberculine (IDR) et de libération de l'interferon gamma (IGRA : Interferon Gamma Release Assay). Tous les patients ayant eu un contact récent (< deux mois) et dont le dépistage initial était négatif, étaient soumis à une seconde série de dépistage huit semaines plus tard, afin d'éliminer les faux négatifs. Tout patient présentant un test de dépistage positif faisait l'objet d'explorations complémentaires pour éliminer une maladie active et confirmer une TB latente. La comparaison des génomes des souches MB des patients A et B, par séquençage complet, a confirmé le lien génétique entre les isolats. Ces résultats couplés à l'enquête épidémiologique privilégiait l'hypothèse d'une contamination zoonotique et/ou alimentaire du patient A (le génome des isolats MB humain était identique à ceux retrouvés chez des bovins mexicain), suivie d'une transmission aérienne vers la patiente B au sein de l'église. Aucun patient présentant un test de dépistage positif pour la TB, n'a développé ensuite de TB. Cependant le taux de prévalence de TB latente retrouvé chez les patients explorés (22%, 39/181), était supérieur à celui attendu au niveau national. Cette observation était probablement liée à la présence dans cette étude d'un grand nombre de patients à risque (soit nés dans un pays endémique pour la TB, soit consommateurs de lait ou de fromage au lait cru non pasteurisé …).

Commentaire

Cet article illustre parfaitement l'épidémiologie des cas de TB humaine à MB dans les pays industrialisés. Ces cas surviennent essentiellement chez des patients originaires de pays où la bTB est répandue et peu contrôlée, et où la consommation d'aliment à base de lait cru non pasteurisé est répandue comme ici au Mexique (2, 11). Dans ces pays où les facteurs de risques zoonotiques de contracter la TB à MB sont importants, la probabilité de transmission interhumaine reste non négligeable. Une étude d'épidémiologie moléculaire de MB réalisée à Mexico, montrait qu'un grand nombre de souches humaines et bovines de MB partageait des profils génétiques communs, appuyant l'hypothèse d'une transmission zoonotique importante dans cette zone (12). Selon une étude du Center for Disease Control and Prevention (CDC) menée en Californie entre 2003-2011 (11), les cas de TB humaine à MB avaient augmenté significativement, l'origine hispanique ainsi que l'immunodépression (en dehors du VIH) constituaient les principaux facteurs de risque. Dans ce cadre, les auteurs préconisaient de réaliser un séquençage de génome complet* pour l'ensemble des isolats de MB chez tous les patients avec une TB microbiologiquement documentée. Cette stratégie permettrait de mettre en place une surveillance épidémiologique et de caractériser les génotypes de MB circulante aux Etats Unis afin d'améliorer le contrôle de cette maladie. Enfin cet article met en exergue l'importance des outils d'épidémiologie moléculaire dédiés à la TB, comme le séquençage de génome complet, s'avérant être une méthode robuste et discriminante pour confirmer les liens épidémiologiques d'isolats mycobactériens retrouvés chez les malades. Cette étude montre aussi, les limites et les difficultés des approches combinées d'épidémiologie de terrain et génétique à confirmer définitivement une transmission interhumaine aérienne à MB (5,13). Dans cette étude, le patient présentait de nombreux facteurs de risque d'exposition à MB, dont l'un était d'avoir travaillé dans une ferme laitière aux Etat-Unis. Si les cas bTB et humains ont considérablement diminué dans les pays industrialisés, les

professionnels de la filière bovine (éleveurs, équarisseurs et vétérinaires) semblent présenter des risques professionnels de contamination à MB de l'animal à l'homme (14) qui doivent être pris en compte dans la protection de ces travailleurs.

Conclusion générale

Les facteurs qui régissent la récurrence, l'émergence et la réémergence des maladies infectieuses restent mal connus. Ces difficultés de compréhension sont dues à la complexité des systèmes infectieux, où un grand nombre de paramètres interviennent et interagissent (hôtes, pathogènes et environnement). C'est le cas de la bTB qui est une maladie infectieuse contagieuse provoquée par MB. Elle touche principalement le bétail, certains ani-maux sauvages, mais également l'homme. Bien que Barbier *et al.* (2016) ainsi que d'autres travaux montrent que MB ait été détecté dans l'environnement par PCR, le rôle de cet écosystème comme réservoir et/ou source de transmission de MB vers les animaux reste à démontrer. La consommation d'eau de boisson contaminée ou l'inhalation d'aérosols contaminés pourraient expliquer l'infection du bétail dans la majorité des cas.

Buss *et al.* (2016) confirme que les techniques d'épidémiologie génétique comme la comparaison des séquences complètes des génomes d'isolats de MB infectants, s'avèrent être des méthodes robustes et discriminantes pour confirmer les liens épidémiologiques de souches infectantes de MB chez les malades ou chez les animaux sources, mais aussi pour mieux appréhender la dynamique de transmission de la TB à MB.

La mondialisation a permis le développement de la circulation des personnes, des animaux et des végétaux, jouant ainsi un rôle central dans la dynamique et les flux des maladies infectieuses. MB est un modèle qui illustre parfaitement cette circulation de pathogènes sans fron-tière, avec des enjeux différents en termes de santé animale et santé publique entre les pays du Nord et du Sud. Cependant l'optimalisation du contrôle de cette maladie qui passe par une meilleur compréhension des modalités de transmission et l'identification des facteurs de risque, nécessite une approche globale (Nord et Sud) et intégrée (animaux, homme et environnement).

General conclusion

The factors that influence the recurrence, emergence and re-emergence of infectious diseases are poorly known. This is due to the complexity of the infectious systems in which a huge number of parameters play a role and interact (hosts, pathogens and environment). This is the case of bTB, a contagious infectious disease caused by MB that affects mainly livestock, some wild animals, but also humans. Although Barbier et al. (2016) as well as other studies show that MB has been detected in the environment by PCR analysis, the role of this ecosystem as reservoir and/or source of MB transmission towards animals has not been demonstrated yet. Drinking contaminated water or inhaling contaminated bioaerosols might explain cattle infection in the majority of cases.

Buss et al. (2016) confirms that the techniques of genetic epidemiology, such as the comparison of the whole-genome sequences of MB isolates from infected patients/animals, are robust and discriminant methods to confirm the epidemiological links of MB strains from infected patients and from the source animals, but also to better understand the transmission dynamics of TB caused by MB.

Globalization has greatly favoured the circulation of people, animals and plants, thus playing a central role in the dynamics and spread of infectious diseases. MB is a model that describes perfectly this circulation of pathogens without borders, with different veterinary and public health issues between countries of the North and of the South. Nevertheless, the optimization of the control of this disease requires a global (North and South) and integrated (animals, humans and environment) approach to better understand the transmission modalities and to identify risk factors.).

Lexique

Complexe *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB): complexe qui comprend les différentes espèces responsables de la tuberculose (TB) (maladie infectieuse et contagieuse). Parmi ces espèces, *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) et Mycobacterium Africanum sont principalement impliquées dans les cas de TB chez l'homme. *Mycobacterium bovis* (MB) est impliqué dans la tuberculose bovine (bTB) chez les animaux d'élevage et sauvages mais touche aussi l'homme. MB est aussi à l'origine de la souche vaccinale atténuée de MB ou bacille Calmette et Guérin.

PCR (Réaction en chaîne par polymérase) : méthode qui permet d'amplifier (de multiplier) un court fragment d'ADN afin de la mettre en évidence ou de le quantifier.

PCR en temps réel ou qRT-PCR : la quantité d'ADN amplifiée est mesurée à chaque cycle d'amplification. La qRT-PCR permet donc d'obtenir en temps réel une quantification absolue de la quantité initiale de l'ADN cible.

Séquençage du génome complet : consiste en l'analyse complète d'un génome pour déterminer la succession de

toutes les bases qui composent l'ADN d'un organisme (bactérie, virus…)
Transmission hypoendémique : désigne une transmission faible intensité avec des effets peu importants sur la population.
Zoonose : infection naturellement transmise de l'animal à l'homme et réciproquement. Les agents étiologiques infectieux sont variés (bactérie, virus, champignons).

Publications de référence

1 Böhm, M., Hutchings, M.R. and White, P.C.L. Contact networks in a wildlife-livestock host community: identifying high-risk individuals in the transmission of bovine TB among badgers and cattle. *PLoS One* 2009; 4

2 Gallivan M, Shah N, Flood J. Epidemiology of human *Mycobacterium bovis* disease, California, USA, 2003-2011. *Emerg Infect Dis* 2015 Mar**; 21**(3):435-43.

3 More SJ, Radunz B, Glanville RJ. Lessons learned during the successful eradication of bovine tuberculosis from Australia. Vet Rec. 2015 Sep 5; 177(9):224-32.

4 Garnett, B.T., Delahay, R.J. and Roper, T.J. Use of cattle farm resources by badgers (*Meles meles*) and risk of bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) transmission to cattle. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 2002; 269: 1487–1491.

5 Evans JT, Smith EG, Banerjee A et al. Cluster of human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*: evidence for person-to-person transmission in the UK. *Lancet;* 2007; Apr 14; 369(9569):1270-6.

6 Adams, A.P., Bolin, S.R., Fine et al. Comparison of PCR versus culture for detection of *Mycobacterium bovis* after experimental inoculation of various matrices held under environmental conditions for extended periods. *Appl Environ Microbiol* 2013; 79**:** 6501–6506.

7 Pontiroli, A., Travis, E.R., Sweeney, F.P et al. Pathogen quantitation in complex matrices: a multioperator comparison of DNA extraction methods with a novel assessment of PCR inhibition. *PLoS One*; 2011.

8 Courtenay, O., Reilly, L.A., Sweeney, F.P et al. Is *Mycobacterium bovis* in the environment important for the persistence of bovine tuberculosis? *Biol Lett* 2006; 71 : 1946–1952.

9 Fine, A.E., Bolin, C.A., Gardiner et al. A study of the persistence of *Mycobacterium bovis* in the environment under natural weather conditions in Michigan, USA. *Vet Med* 2011.

10 King, H.C., Murphy, A., James, P et al. The variability and seasonality of the environmental reservoir of *Mycobacterium bovis* shed by wild European badgers. *Sci Rep* 2015; 5 :1–7.

11 Gallivan M, Shah N, Flood J Epidemiology of human *Mycobacterium bovis* disease, California, USA, 2003-2011. Emerg Infect Dis. 2015; Mar; 21(3):435-43.

12 Rodwell TC, Kapasi AJ, Moore M et al. Tracing the origins of *Mycobacterium bovis* tuberculosis in humans in the USA to cattle in Mexico using spoligotyping. *Int J Infect Dis* 2010 Sep; 14 Suppl 3: 129-35.

13 LoBue PA, LeClair JJ, Moser KS. *Contact investigation for cases of pulmonary Mycobacterium bovis. Int J Tuberc Lung Dis* 2004 Jul; 8 (7):868-72.

14 Sunder S, Lanotte P, Godreuil S, et al. Human-to-human transmission of tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* in immunocompetent patients. *J Clin Microbiol* 2009; Apr; 47(4):1249-51.

Revues de la littérature

El-Sayed A, El-Shannat S, Kamel M et al. Molecular Epidemiology of *Mycobacterium bovis* in Humans and Cattle. Zoonoses Public Health. 2015 Dec 18.

More SJ, Radunz B, Glanville RJ. Lessons learned during the successful eradication of bovine tuberculosis from Australia. Vet Rec. 2015 Sep; 5;177(9):224-32.

Gallivan M, Shah N, Flood J. Epidemiology of human *Mycobacterium bovis* disease, Californi USA, 2003-2011.Emerg Infect Dis. 2015 Mar; 21(3):435-43.

Autres publications identifiées

Trewby H, Wright D, Breadon EL et al. Use of bacterial whole-genome sequencing to investigate local persistence and spread in bovine tuberculosis. *Epidemics* 2016; Mar;14:26-35.
Les études d'épidémiologie moléculaire de M. bovis *sont fondamentales pour comprendre la dynamique de transmission de ce pathogène dans les cheptels bovins. Dans cet article, les auteurs montrent l'apport de l'utilisation du séquençage du génome entier pour étudier les souches de MB isolées dans les cheptels contaminés en Angleterre. Cet article met en exergue que l'utilisation systématique de cette technologie permettrait une compréhension plus fine de la transmission et de la persistance de certains génotypes de MB dans bétail, favorisant ainsi, la mise en œuvre d'une lutte plus efficace contre la tuberculose bovine.*

Barasona JA, Vicente J, Díez-Delgado I et al. Environmental Presence of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Aggregation Points at the Wildlife/Livestock Interface. *Transbound Emerg Dis.* 2016 Feb 10.
Les sources d'eau où s'abreuvent les animaux d'élevage et sauvages semblent être des zones privilégiées de contamination indirecte de la tuberculose bovine entre les animaux infectés et sains. Dans cet article, la stratégie développée, est basée sur la détection par PCR des espèces du complexe Mycobacterium tuberculosis *(MTBC) dans l'environnement aquatique, couplée, à la détection par caméra à déclenchement automatique des animaux. Les auteurs mettent en évidence une corrélation entre la présence d'animaux s'abreuvant suspectés de TB bovine (cachectiques) et la détection de CMTB dans ces points d'eau. Les informations fournis par cette étude permettront de mieux cibler les actions et les stratégies de lutte contre la tuberculose à l'interface entre la faune sauvage et d'élevage.*

Khattak I, Mushtaq MH, Ahmad MU et al. Zoonotic tuberculosis in occupationally exposed groups in Pakistan. Occup Med (Lond). 2016 Mar 30.

Les professionnels de la filière bovine (éleveurs, équarisseurs et vétérinaires) semblent être exposés à des risques non négligeables de contamination à MB de l'animal à l'homme. Ces risques sont majorés au sein des abattoirs situés dans les pays du Sud, où la prévalence de la tuberculose bovine est importante. Dans cette étude, réalisée dans un abattoir du Pakistan, les auteurs montrent un nombre de cas significatif de TB humaine à MB chez les employés, lié à une contamination zoonotique. Cette étude met en exergue la nécessité de mettre en place des équipements de protection et des techniques de travail appropriées pour limiter ce risque de TB zoonotique professionnelle.

Liens d'intérêts :

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

anses
agence nationale de sécurité sanitaire
alimentation, environnement, travail

Connaître, évaluer, protéger

Bulletin de veille scientifique

Édition scientifique • Bulletin de veille n° 31 • Mars 2017
Notes d'actualité scientifique

Pathologies

Le stress oxydatif est-il responsable de la toxicité des mycotoxines sur le système reproducteur mâle ?

Myriam BOUSLAMA |**myriam.bouslama@gmail.com**

INRS - EVAD - Paris

Mots clés : **Cellules de Leydig, cytotoxicité, mycotoxine, stéroïdogenèse, stress oxydatif, testicule**

Les mycotoxines sont des substances toxiques sécrétées par des champignons microscopiques ou moisissures, qui peuvent contaminer de nombreux aliments. Certaines moisissures du genre *Fusarium,* qui contaminent fréquemment les céréales en Europe, sécrètent des mycotoxines ou trichothécènes, tels le déoxynivalénol (DON), la toxine T2, et la zéaralénone (ZEA). Elles sont responsables de nombreux effets sur la santé chez l'animal, notamment des effets toxiques pour la reproduction. La ZEA est un perturbateur endocrinien* dont les effets sont principalement liés à ses propriétés œstrogéniques. *In vivo*, ses effets sur la reproduction sont bien documentés chez la femelle mais les études sur la reproduction mâle sont plus rares. Chez la souris, elle perturbe le système reproducteur mâle en diminuant le niveau de testostérone, la qualité du sperme et la fertilité(1). Des effets sur la reproduction mâle ont également été observés pour DON (2) et la toxine T2 (3) chez le rongeur mais les mécanismes impliqués restent inconnus.

Cette note analyse deux études évaluant les effets cytotoxiques de ces trois mycotoxines sur des lignées murines de cellules de Leydig*. L'utilisation de différentes molécules antioxydantes pour prévenir les effets cytotoxiques de ces mycotoxines est testée et permet d'indiquer si les mécanismes impliqués dans les troubles de reproduction mâle sont liés au stress oxydatif*.

La prévention du stress oxydatif lié au deoxynivalenol et à la zéaralénone ne restaure pas les fonctions des cellules de Leydig MA-10.

Savard C. et al. (2016). Prevention of deoxynivalenol- and zearalenone-associated oxidative stress does not restore MA-10 Leydig cell fonctions.Toxicology, vol. 341–343: p.17-27.

Résumé

Cette étude évalue l'effet des mycotoxines DON et ZEA, seules ou en combinaison, sur la viabilité des cellules de Leydig, la stéroïdogenèse* et le stress oxydatif. L'efficacité de deux antioxydants, vitamine E et sésamine, pour prévenir les effets délétères des mycotoxines a également été testée. Des cellules de Leydig murines MA-10 ont été exposées pendant 24 heures à des concentrations croissantes de DON (0,1 à 2 µM), ZEA (5 à 100 µM) ou à un mélange de DON (0,05, 0,1 et 0,25 µM) et de ZEA (10, 20 et 30 µM). Les résultats montrent que la viabilité cellulaire diminue à partir de 0,25 µM de DON (IC_{50}* = 0,26 µM) et à partir de 25 µM de ZEA (IC_{50}=34 µM). Aux concentrations de DON n'affectant pas la viabilité cellulaire, l'expression basale des gènes impliqués dans la stéroïdogenèse (*Cyp11a, Hsd3b, Lhr, Nr4a1, Star*) n'est pas modifiée. Cependant, en réponse à la forskoline*, l'expression des gènes Lhr, Nr4a1 et Star est modifiée. Pour la ZEA, l'expression des gènes est altérée avec ou sans forskoline*. En outre, à la fois pour DON et ZEA, l'inhibition de l'expression du gène *Star* en réponse à la forskoline est plus nette que pour les autres gènes testés, DON ou ZEA seules n'ont pas d'effet sur la sécrétion basale de progestérone mais entraînent une diminution de sa sécrétion en réponse à la forskoline. L'exposition au mélange des deux mycotoxines DON et ZEA n'a pas d'effets additifs ou synergiques sur la viabilité cellulaire, l'expression du gène *Star* et la sécrétion de progestérone avec ou sans forskoline. Les cellules de Leydig exposées à DON (0,25 µM) ou ZEA (30 µM) augmentent la production de ROS* mais le prétraitement par la sésamine et la vitamine E, seules ou en combinaison, permet de réduire le stress oxydatif généré par ces mycotoxines et d'augmenter la viabilité cellulaire. En revanche, ce traitement ne permet pas de restaurer une production normale de progestérone.

Commentaire

Les cellules utilisées sont des cellules de Leydig murines tumorales et fonctionnelles du point de vue de la stéroïdogenèse. Ces cellules ne produisent pas de testostérone car l'enzyme responsable de l'hydroxylation de la progestérone est faiblement exprimé. Par conséquent le produit synthétisé au cours de la stéroïdogenèse dans les cellules MA-10 est principalement la progestérone.

Il s'agit de la première étude à décrire un effet cytotoxique de DON sur les cellules de Leydig (IC_{50} 130 fois supérieure à celle de ZEA). L'utilisation des antioxydants confirme que le stress oxydatif induit par DON et ZEA est responsable de cette cytotoxicité.

Aux concentrations n'affectant pas la viabilité cellulaire, DON et ZEA diminuent la sécrétion de progestérone en réponse à la forskoline. Ces résultats sont en accord avec ceux observés sur des cellules de la granulosa* de bovins (4) et sur la lignée cellulaire H295R* issue d'un carcinome surrénalien humain (5,6) pour les deux mycotoxines ou sur des cultures primaires de cellules de Leydig murines pour ZEA (7). L'inhibition du gène *Star*, initiateur du transport de cholestérol vers la mitochondrie, montre que la stéroïdogenèse est altérée dès les premiers stades de biosynthèse. En revanche, les antioxydants ne permettent pas d'améliorer la stéroïdogenèse. D'autres mécanismes pourraient expliquer

l'altération de la stéroïdogenèse, tels que l'inhibition de la synthèse protéique pour DON, des actions directs sur les récepteurs hormonaux, des modifications épigénétiques* (8) ou une perturbation métabolique par activation des récepteurs PPAR*(9).

Cytotoxicité et dommages de la toxine T2 sur les cellules de Leydig TM3

Yuan Z. et al. (2016). T-2 toxin-induced cytotoxicity and damage on TM3 Leydig cells. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, vol. 181–182: p.47-54.

Résumé

Cette étude évalue les effets cytotoxiques de la toxine T2 sur une lignée de cellules de Leydig murines (TM3), aux concentrations de 0, 1, 10 et 100 nM pendant 24 heures. La viabilité cellulaire, évaluée par le test au MTT*, diminue de manière dose-dépendante (82,9 - 63,5 et 32,8 % de viabilité cellulaire pour les trois concentrations testées respectivement). De même, la sécrétion de l'enzyme LDH* est augmentée de 100 et 200 % aux concentrations de 10 et 100 nM. Un stress oxydatif, observé aux trois concentrations testées, est caractérisé par une diminution dose-dépendante de l'activité des enzymes anti-oxydantes (SOD*, CAT*, GPX*), une augmentation de la MDA* et une augmentation de la production de ROS mesuré par le test fluorimétrique avec la DCFH-DA*. Aux trois concentrations (1, 10 et 100 nM) les résultats indiquent une toxicité caractérisée par l'entrée en apoptose des cellules de Leydig (12,8 ; 16,7 et 23,13 % des cellules respectivement) et des lésions de l'ADN (pourcentage d'ADN de queue* : 7,1 ; 17,1 et 29,6% respectivement). Enfin, le traitement avec l'antioxydant Trolox protège les cellules TM3 contre la cytotoxicité induite par la toxine T2.

Commentaire

Des études précédentes ont montré que la toxine T2 altère la stéroïdogenèse des cellules de Leydig murines (10). Aux mêmes concentrations, la toxine T2 est toxique pour les cellules de Leydig, avec une inhibition de la prolifération cellulaire, une augmentation de la peroxydation lipidique, une altération de la membrane cellulaire, des lésions de l'ADN et une entrée en apoptose. Le stress oxydatif, caractérisé par un déséquilibre entre une production accrue de ROS et une diminution de l'activité des enzymes antioxydantes, est responsable de cette cytotoxicité. En revanche, et contrairement à l'étude précédente, la stéroïdogenèse n'est pas analysée et il aurait été intéressant de connaître l'effet de la toxine T2 sur la stéroïdogenèse à des doses non toxiques et le pouvoir antioxydant du Trolox sur l'altération de la stéroïdogenèse observée dans les études précédentes.

Conclusion générale

La ZEA, DON, et la toxine T2 induisent un stress oxydatif qui joue un rôle majeur dans les effets cytotoxiques sur les cellules de Leydig, conforté par la réduction du stress en présnce d'antioxydants. En revanche, à des concentrations n'affectant pas la viabilité cellulaire, ces mycotoxines peuvent altérer la stéroïdogenèse par des mécanismes indépendants du stress oxydatif. Les différences interespèces dans les fonctions des cellules de Leydig et dans les effets des mycotoxines sur la stéroïdogenèse soulignent l'intérêt de développer un modèle cellulaire de cellules de Leydig humaines pour évaluer les risques pour la santé humaine. Néanmoins, les mécanismes de cytotoxicité des mycotoxines via le stress oxydatif et l'altération de la stéroïdogenèse ont été observés dans différents modèles cellulaires, in vivo et dans plusieurs espèces. Même si les mécanismes ne sont pas clairement identifiés, l'ensemble de ces résultats soulignent l'importance de prendre en compte les effets perturbateurs endocriniens dans l'évaluation des risques liés à la présence de ces mycotoxines dans l'alimentation. Il convient de s'assurer à l'avenir que les études pivots utilisées pour la définition des valeurs toxicologiques de référence de ces mycotoxines prennent en compte les niveaux d'exposition susceptibles de montrer des effets sur la reproduction.

General conclusion

ZEA, DON and T2 toxin induce oxidative stress that plays a major role in their cytotoxic effects on Leydig cells. This toxicity is reduced by antioxidants. However, at non-toxic concentrations, these mycotoxins may affect steroidogenesis through an oxidative stress-independent mechanism. Interspecies differences in the functions of Leydig cells and in the effects of mycotoxins on steroidogenesis emphasize the need to develop a human Leydig cell model to assesshuman health risk. Nevertheless, oxidative stress-dependent cytotoxicity of mycotoxins and steroidogenesis disruption have been observed in different cell models, in vivo and in several species. Although the mechanisms were not clearly identified, all results underline the importance of taking into account endocrine disruption effects in risk assessment of mycotoxins in food. It should be ensured in future that the pivotal studies used to define the toxicological reference values of these mycotoxins take into account the levels of exposure likely to show effects on reproduction.

Lexique

Apoptose : mort cellulaire programmée.
Catalase (CAT) : enzyme qui réduit le stress oxydatif en catalysant la dismutation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau et oxygène.
Cellules de Leydig : cellules situées dans l'espace interstitiel testiculaire, entre les tubules séminifères, assurant la biosynthèse des stéroïdes dont le plus important est la testostérone.
Cellules de Sertoli : cellules de soutien aux cellules germinales, situées au sein des tubes séminifères, et contrôlant la spermatogenèse.
27-dichlorofluorescin diacetate (DCFH-DA) : sonde fluorescente communément utilisée pour évaluer le stress oxydatif.
Glutathion peroxydase (GPX) : enzyme qui réduit le stress oxydatif en transformant les hydoperoxydes organiques.
Forskoline : activateur de la voie AMPc qui stimule la stéroïdogenèse
Granulosa : cellules folliculaires granuleuses entourant l'ovocyte et la cavité liquidienne du follicule ovarien et responsable de la sécrétion de la progestérone.
H295R : lignée cellulaire de carcinome surrénalien humain, utilisée dans l'essai *in vitro* de stéroïdogenèse décrit dans la ligne directrice de l'OCDE n°456.
IC_{50} : concentration inhibitrice médiane. Il s'agit ici de la concentration nécessaire pour inhiber la viabilité cellulaire de la moitié de la population cellulaire.
LDH : lactate déshydrogénase, enzyme relargué lors de la mort cellulaire, à cause de la perte de l'intégrité plasmatique. L'augmentation de l'activité de cette enzyme cytoplasmique dans le surnageant de culture cellulaire peut être mesurée par un test colorimétrique ce qui reflète l'altération de la perméabilité membranaire des cellules.
Malondialdéhyde (MDA) : marqueur de la peroxydation lipidique (stress oxydatif).
Modifications épigénétiques : modifications qui ne sont pas codées par l'ADN (méthylation de l'ADN, modifications d'histones et remodelage des nucléosomes).
Perturbateur endocrinien : substance exogène qui interfère avec la production, la libération, le transport, le métabolisme, l'action ou l'élimination d'hormones naturelles
Peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) : récepteurs activés par les inducteurs de la prolifération des péroxysomes. Famille des récepteurs du noyau cellulaire impliqués dans le métabolisme des lipides.
Pourcentage d'ADN de queue : critère mesuré lors du test des comètes et qui reflète l'ampleur des cassures de l'ADN, exprimé sous forme de pourcentage.
Reactive Oxygen Species (ROS) ou espèces réactives de l'oxygène : Il s'agit d'espèces chimiques oxygénées telles que des radicaux libres, des ions oxygénés et des peroxydes, rendus chimiquement très réactifs par la présence d'électrons de valence non appariés. Elles sont produites de façon accrue lors d'un stress oxydant.
Superoxyde dismutase (SOD) : enzyme réduisant le stress oxydatif.
Stress oxydatif : type d'agression des constituants de la cellule dû aux espèces réactives oxygénées et azotées oxydantes.
Stéroïdogenèse : synthèse des hormones stéroïdiennes, c'est-à-dire ayant pour origine le cholestérol.
Test MTT : test colorimétrique pour évaluer la viabilité cellulaire. Dans les cellules vivantes, un sel de tétrazolium jaune (le bromure de 3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium (MTT)) est réduit par une enzyme mitochondriale en formazan de couleur bleue. L'intensité de la coloration bleue est proportionnelle au nombre de cellules vivantes

Publications de référence

1 Yang JY, Wang GX, Liu JL, et al. Toxic effects of zearalenone and its derivatives α-zearalenol on male reproductive system in mice. *Reproductive Toxicology* 2007, 24(3–4):381-387.

2 Sprando RL, Collins TF, Black TN, et al. Characterization of the effect of deoxynivalenol on selected male reproductive endpoints. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 2005, 43(4):623-635.

3 Yang JY, Zhang YF, Liang AM, et al. Toxic effects of T-2 toxin on reproductive system in male mice. *Toxicology and industrial health* 2010, 26(1):25-31.

4 Pizzo F, Caloni F, Schreiber NB, et al. In vitro effects of deoxynivalenol and zearalenone major metabolites alone and combined, on cell proliferation, steroid production and gene expression in bovine small-follicle granulosa cells. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 2016, 109:70-83.

5 Frizzell C, Ndossi D, Verhaegen S, et al. Endocrine disrupting effects of zearalenone, alpha-and beta-zearalenol at the level of nuclear receptor binding and steroidogenesis. *Toxicology Letters* 2011, 206(2):210-217.

6 Ndossi DG, Frizzell C, Tremoen NH, et al. An in vitro investigation of endocrine disrupting effects of trichothecenes deoxynivalenol (DON), T-2 and HT-2 toxins. *Toxicology Letters* 2012, 214(3):268-278.

7 Liu Q, Wang Y, Gu J, et al. Zearalenone inhibits testosterone biosynthesis in mouse Leydig cells via the crosstalk of estrogen receptor signaling and orphan nuclear receptor Nur77 expression. *Toxicology in Vitro* 2014, 28(4):647-656.

8 Han J, Wang Q-C, Zhu C-C, et al. Deoxynivalenol exposure induces autophagy/apoptosis and epigenetic modification changes during porcine oocyte maturation. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2016, in press.

9 Li Y, Zhang B, Huang K, et al. Mitochondrial proteomic analysis reveals the molecular mechanisms underlying reproductive toxicity of zearalenone in MLTC-1 cells. *Toxicology* 2014, 324:55-67.

10 Yang JY, Zhang YF, Meng XP, et al. T-2 toxin inhibits gene expression and activity of key steroidogenesis enzymes in mouse Leydig cells. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 2015, 29(5):1166-1171.

Revues de la littérature

Tavares RS, Escada-Rebelo S, Correia M, et al**.** The non-genomic effects of endocrine-disrupting chemicals on mammalian sperm. *Reproduction* 2016, 151(1):R1-R13.

Odermatt A, Strajhar P, Engeli RT. Disruption of steroidogenesis: Cell models for mechanistic investigations and as screening tools. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2016, 158:9-21.

Escrivá L, Font G, Manyes L. In vivo toxicity studies of fusarium mycotoxins in the last decade: A review. *Food and Chemical Toxicology* 2015, 78:185-206.

Wang X, Wu Q, Wan D et al. Fumonisins : oxidative stress-mediated toxicity and metabolism in vivo and in vitro**.** *Archives of Toxicology* 2016, 90(1):81-101.

Autres publications identifiées

Deng C, Ji C, Qin W, Cao X, et al. Deoxynivalenol inhibits proliferation and induces apoptosis in human umbilical vein endothelial cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2016, 43:232-241.
Cette étude évalue les effets toxiques de DON sur les cellules endothéliales humaines isolées à partir de la veine ombilicale (concentrations de 100 à 1000 ng/L). DON inhibe la viabilité et la prolifération cellulaires, et provoque un stress oxydatif et une apoptose des cellules endothéliales.

Zheng W, Pan S, Wang G, et al. Zearalenone impairs the male reproductive system functions via inducing structural and functional alterations of sertoli cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2016, 42:146-155.
Cette étude évalue les effets toxiques de la ZEA sur les cellules de Sertoli de rat (concentrations de 5 à 20 µg/mL pendant 24 heures). La ZEA perturbe les fonctions sécrétoires des cellules de Sertoli, la structure du cytosquelette et l'ultrastructure des cellules, ce qui contribuerait à la toxicité reproductive mâle de cette mycotoxine.

Patrick SM, Bornman MS, Joubert AM, et al. Effects of environmental endocrine disruptors, including insecticides used for malaria vector control on reproductive parameters of male rats. *Reproductive Toxicology* 2016, 61:19-27.
Dans cette étude chez le rat, l'exposition in utero et pendant la lactation à un mélange de perturbateurs endocriniens dont la ZEA (2,5µg/kg) provoque une augmentation du poids des testicules, une altération histologique des tubes séminifères et une augmentation de la concentration de testostérone sérique.

Liens d'intérêts :

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

Influence des polluants environnementaux sur l'incidence des troubles neurologiques : deux méthodes d'évaluation à grande échelle de la neurotoxicité développementale des produits chimiques

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

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

Mots clés : **Autisme, cellules souches pluripotentes induites, cerveau, développement, environnement, fongicides, hyperactivité, neurones, neurotoxines, pesticides**

Ces dernières années, l'incidence des troubles du développement neurologique chez l'enfant, comme l'hyperactivité, les troubles du spectre autistique* et la dyslexie, a fortement augmenté. Cela pourrait être en partie dû à l'utilisation de certains produits chimiques. Par exemple, l'exposition à certains pesticides pendant la grossesse est associée à l'augmentation du risque d'autisme chez l'enfant. Les études rétrospectives ne permettent pas d'identifier, parmi les quelques 480 000 produits chimiques présents dans l'environnement, les plus dangereux pour le cerveau humain en développement. Il existe donc une nécessité réelle de développer des techniques efficaces, reproductibles et à grande échelle pour identifier ces produits dangereux. Dans les articles sélectionnés, les auteurs utilisent deux techniques différentes de criblage d'un grand nombre de produits chimiques afin d'évaluer leur neurotoxicité* sur différents modèles de neurones en culture. Dans la première étude, les auteurs ont cherché à identifier de façon prospective, parmi près de 300 composés, ceux qui provoquent sur des neurones de souris en culture des signatures transcriptionnelles* similaires à celles des troubles neurologiques associés à l'autisme, au vieillissement, et à certaines maladies neurodégénératives (Alzheimer et Huntington). Dans la seconde étude, les auteurs ont testé 76 composés pour leur capacité à inhiber la croissance des neurites* sur des cultures neuronales issues de cellules souches pluripotentes induites (iPS)* d'origine humaine.

Identification de produits chimiques qui miment les changements transcriptionnels associés à l'autisme, le vieillissement du cerveau et les maladies neurodégénératives

Pearson BL. et al. (2016). Identification of chemicals that mimic transcriptional changes associated with autism, brain aging and neurodegeneration. Nat Commun, vol 7: p.11173.

Résumé

Les technologies récentes ont permis d'identifier des centaines de mutations génétiques impliquées dans les troubles du spectre autistique (1,2), mais les facteurs environnementaux joueraient aussi un rôle dans le développement de ces maladies (3). Il existe dans le cerveau des modifications transcriptionnelles retrouvées post-mortem, associées aux troubles du spectre autistique (4,5). Elles sont caractérisées par la réduction de l'expression de certains gènes impliqués dans la transmission synaptique* et l'augmentation de l'expression de gènes liés à l'immunité et à la microglie*. Cette signature transcriptionnelle peut donc servir de base pour prospecter des produits chimiques neurotoxiques, potentiellement dangereux pour le cerveau humain en cours de développement. Ici, les auteurs utilisent comme modèle d'étude des cultures cellulaires primaires mixtes, issues de cerveaux d'embryons de souris, contenant 70% de neurones mais aussi d'astrocytes* et de la microglie. Ils examinent les changements transcriptionnels intervenant dans ces cellules après 24h d'exposition à une dose subtoxique d'un des 294 produits chimiques testés, parmi lesquels figurent des pesticides, fongicides* et des plastifiants*. Cette technique leur permet d'identifier six groupes de composés neurotoxiques. Parmi eux, un groupe contient huit composés dont les effets miment la signature transcriptionnelle caractéristique des troubles autistiques et présente également des similitudes avec celles du vieillissement, de la maladie d'Alzheimer et de la maladie de Huntington. Dans ce groupe figurent des fongicides, qui inhibent l'activité du complexe III de la chaîne respiratoire mitochondriale* (6), et la roténone, qui inhibe l'activité du complexe I de cette même chaîne (7). Dans les deux cas, la neurotoxicité de ces produits serait liée à l'augmentation de la production des radicaux libres* et à la perturbation du cytosquelette*. Globalement, cette étude s'avère pertinente en démontrant que l'identification à grande échelle de composés mimant au niveau transcriptionnel des maladies neurologiques humaines est possible dans des cultures neuronales mixtes de souris. De plus, le potentiel thérapeutique de certaines molécules peut également être testé par cette même approche.

Commentaire

Cette étude décrit une méthode de criblage d'expression des gènes permettant d'identifier dans des cultures de neurones corticaux de souris les composés chimiques dont les effets miment au niveau transcriptionnel certaines maladies neurologiques. Par cette technique, les auteurs identifient la roténone, pesticide déjà connu pour ses effets neurotoxiques augmentant le risque de maladie de Parkinson (8), mais aussi des composés appartenant à une nouvelle classe de fongicides (inhibiteurs externes de la quinone) utilisés dans l'agriculture et présents dans l'alimentation humaine. Ces composés partagent des mécanismes neurotoxiques communs impliquant le dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale. Ils provoquent une signature transcriptionnelle neuronale présentant des similitudes avec celles de l'autisme, du vieillissement et de certaines maladies neurodégénératives. Ceci suggère des processus neurotoxiques communs à ces maladies pourtant très différentes en terme de symptomatologie et d'âge d'apparition. Enfin, la méthode décrite pourrait également servir à identifier des molécules thérapeutiques. Globalement, bien que le modèle d'étude choisi soit critiquable du point de vue de sa pertinence par rapport au cerveau humain en développement (9), cette étude ouvre une voie nécessaire pour une approche prospective à grande échelle des composés chimiques présents dans l'environnement qui pourraient impacter les neurones en développement et favoriser des maladies neurologiques chez l'Homme.

Analyse de la croissance des neurites dans les neurones dérivés de cellules souches pluripotentes d'origine humaine comme méthode de criblage à haut débit de la neurotoxicité développementale ou de la neurotoxicité.

Ryan KR. et al. (2016). Neurite outgrowth in human induced pluripotent stem cell-derived neurons as a high-throughput screen for developmental neurotoxicity or neurotoxicity. Neurotoxicology. Vol. 53: p.271-81.

Résumé

Face à l'augmentation de l'incidence des troubles neurologiques tels que l'autisme et les troubles du déficit de l'attention avec hyperactivité (TDAH), il est nécessaire d'évaluer le potentiel neurotoxique chez l'enfant des différents produits chimiques présents dans l'environnement (10). Dans cet article, les auteurs choisissent d'étudier l'impact de 76 composés chimiques de différentes classes (agents ignifuges*, hydrocarbures aromatiques polycycliques*…), à différentes concentrations, sur la croissance des neurites. Le modèle cellulaire utilisé est celui des iPS humaines différenciées en cellules souches neurales (11). Parmi l'ensemble des composés chimiques testés, 37 ont été décrits au préalable comme étant des neurotoxines. Dans un premier temps les auteurs ont validé leur méthode en testant sa reproductibilité et la pertinence de l'analyse de données effectuée grâce à différents contrôles et réplicats. Puis l'effet des composés est testé sur différents paramètres : la croissance totale, le nombre d'embranchements, le nombre de prolongements et la viabilité cellulaire. Parmi les molécules testées, 38 ont des effets toxiques, dont 21 étaient préalablement identifiées comme neurotoxines et six (dont le carbaryl, la dieldrine, le chlorure de méthylmercure et la roténone) s'avèrent être de manière reproductible des inhibiteurs sélectifs de la croissance des neurites. Cette étude décrit donc une technique d'identification des substances neurotoxiques sur un modèle cellulaire neuronal d'origine humaine qui permettrait d'identifier et de prioriser les composés en vue de leur étude *in vivo*.

Commentaire

Cette étude s'inscrit dans la démarche visant à développer des méthodes d'évaluation pour tester rapidement et efficacement la toxicité des nombreux composés chimiques présents dans l'environnement sur le développement neuronal. Les auteurs décrivent ici une méthode d'identification à haut débit, sur un modèle neuronal d'origine humaine, de la neurotoxicité développementale de différents produits chimiques de toxicité connue et inconnue. Ceci constitue un modèle prédictif intéressant qui pourrait compléter les tests déjà existants. Il est toutefois nécessaire de noter que le choix de la croissance des neurites comme paramètre unique de toxicité est très restrictif et ne permet pas d'évaluer tous les aspects possibles par lesquels des substances peuvent nuire au fonctionnement et/ou au développement neuronal et cérébral. De plus, bien que prometteur, ce test présente à ce jour un problème de reproductibilité inter-réplicats qui mérite d'être résolu ainsi que quelques incohérences avec les résultats de la littérature.

Conclusion générale

Du fait de l'augmentation de la prévalence des désordres neurologiques tels que l'autisme et les troubles de l'attention dans nos sociétés, il est important de développer de nouvelles techniques d'évaluation de l'implication éventuelle des polluants chimiques environnementaux dans de tels phénomènes. Les deux articles sélectionnés émanant de deux groupes américains décrivent des méthodes différentes d'identification à haut débit de molécules neurotoxiques parmi les composés chimiques présents dans l'environnement, comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques ou des pesticides et agents ignifuges. Cette démarche s'inscrit dans la droite ligne du programme américain Tox21 répondant à l'urgence de connaître le potentiel toxique des produits chimiques présents dans l'environnement afin de minimiser les risques pour la santé humaine (12.) Jusqu'ici, les tests développés par Tox21 concernent différents aspects de la cytotoxicité mais pas spécifiquement le système nerveux central. Ces études permettent donc d'envisager de combler cette lacune.

GENERAL CONCLUSION

Due to the increasing prevalence of neurological disorders such as autism and attention disorders in our socie-ty, it is important to develop new techniques for as-sessing the possible involvement of environmental chemical pollutants in such phenomena. The two select-ed articles from two US teams describe two different high-throughput, high-content assays for identifying neurotoxic molecules among the environmental chemi-cal compounds, such as polycyclic aromatic hydrocarbons or pesticides and flame retardants. This falls in line with the US Tox21 program responding to the urgency of knowing the toxic potential of environmental chemicals in order to minimize the risks to human health (12). So far, tests developed by Tox21 concern different aspects of the cytotoxicity but not specifically the central nervous system. These studies allow considering to fill this gap.

Lexique

Agents ignifuges ou retardateurs de flamme : substances utilisées pour éviter l'inflammation de matériaux, ou la retarder et ralentir la propagation des flammes, en interrompant ou en gênant la combustion. Les matériaux ainsi protégés dans les habitations, les établissements recevant du public, le transport, le matériel électrique et électrotechnique, favorisent l'exposition humaine aux agents ignifuges, dont certains comme les bromés, sont suspectés d'être toxiques.

Astrocytes : cellules non-neuronales 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.

Chaîne respiratoire mitochondriale : association de complexes protéiques (complexes I, II, III, IV, coenzyme Q et cytochrome c) présents au sein de la membrane interne de la mitochondrie et responsable, avec l'ATP synthétase, de la phosphorylation oxydative.

Cytosquelette : ensemble des filaments protéiques qui s'entrecroisent dans les cellules et qui sont de trois types : les filaments d'actine ou microfilaments, les microtubules et les filaments intermédiaires. Ces deux derniers assurent en particulier une certaine rigidité à la cellule et servent à la localisation et au transport des organites cellulaires

Fongicides : produits phytosanitaires appartenant aux pesticides dont la propriété est de contrôler, repousser ou détruire les champignons susceptibles de se développer sur les cultures.

Hydrocarbures aromatiques polycycliques : composés générés par la combustion de matières fossiles (notamment par les moteurs diesels) sous forme gazeuse ou particulaire. Le passage des hydrocarbures dans l'organisme humain s'effectue par inhalation, par ingestion, mais également par transfert au travers de la peau.

iPS ou Cellules Souches Pluripotentes induites : différentes des cellules souches embryonnaires, les iPS ont pour origine une cellule adulte somatique, redevenue pluripotente grâce à l'action de facteurs de croissance et de facteurs de transcription. Elles peuvent être d'origine murine ou humaine. L'étape de re-différenciation est guidée *in vitro* par l'utilisation de facteurs de croissance adaptés. Cette étape permet d'obtenir des cellules différenciées telles que les cellules cardiaques, sanguines, du muscle lisse, des hépatocytes, des cellules rétiniennes ou encore des neurones.

Microglie : cellules immunitaires du système nerveux central. Petites et fortement ramifiées, elles sont très mobiles et patrouillent en permanence le parenchyme cérébral avec leurs prolongements cellulaires. Fonctionnellement proches des macrophages périphériques, elles 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.

Neurites : prolongements cellulaires du neurone, comprenant axone et dendrites.

Neurotoxicité : toxicité au niveau des neurones.

Plastifiants : rendent le plastique souple et flexible. A titre d'exemple, le polychlorure de vinyle est rigide ; par ajout de plastifiants tels les phtalates d'alkyle, il devient souple.

Radicaux libres : issus du fonctionnement cellulaire des organismes qui consomment de l'oxygène, ils sont responsables du stress oxydatif. En cas d'excès, ils peuvent causer inflammation et des dommages à l'ADN favorisant la survenue de cancers ou de maladies neurodégénératives par exemple.

Signature transcriptionnelle : issue de l'analyse du transcriptome (ensemble des ARN issus de la transcription du génome), une « signature transcriptionnelle », basée sur des données d'expression génique, permet de caractériser des sous-ensembles spécifiques de certains types cellulaires par exemple, ou de certaines pathologies.

Transmission synaptique : permet le passage de l'influx nerveux d'un neurone dit pré-synaptique vers un neurone dit post-synaptique. Cette transmission est réalisée grâce à la libération par le neurone pré-synaptique de neurotransmetteurs stockés dans les vésicules synaptiques. Les neurotransmetteurs agissent au niveau post-synaptique sur les récepteurs spécifiques qui transmettent le message à l'intérieur du neurone. Le neurone post-synaptique réagit aux neurotransmetteurs en modifiant son activité électrique, biochimique et même génétique

Troubles du spectre autistique (TSA) : ensemble de désordres neurologiques qui étaient connus sous les noms d'autisme**,** de syndrome d'Asperger**,** de trouble envahissant du développement non spécifié et de trouble désintégratif de l'enfance**.**

Publications de référence

1 De Rubeis S et al. Synaptic, transcriptional and chromatin genes disrupted in autism. *Nature* 2014;**515**:209-15.

2 Iossifov I et al. The contribution of de novo coding mutations to autism spectrum disorder. *Nature* 2014;515:216-21.

4 Gupta S et al. Transcriptome analysis reveals dysregulation of innate immune response genes and neuronal activity-dependent genes in autism. *Nat Commun* 2014;5:5748.

5 Voineagu I et al. Transcriptomic analysis of autistic brain reveals convergent molecular pathology. *Nature* 2011;474:380-4.

7 Sherer TB et al. Mechanism of toxicity of pesticides acting at complex I: relevance to environmental etiologies of Parkinson's disease. *J Neurochem* 2007;100:1469-79.

9 Chen J et al. Selective vulnerability of neurons in primary cultures and in neurodegenerative diseases. *Rev Neurosci* 2008;**19**:317-26.

10 Crofton KM et al. Developmental neurotoxicity testing: recommendations for developing alternative methods for the screening and prioritization of chemicals. *ALTEX* 2011;**28**:9-15.

11 Ben-Reuven L et al. Modeling the autistic cell: iPSCs recapitulate developmental principles of syndromic and nonsyndromic ASD. *Dev Growth Differ* 2016.

12 Shukla SJ et al. The future of toxicity testing: a focus on in vitro methods using a quantitative high-throughput screening platform. *Drug Discov Today* 2010;15:997-1007.

Revues de la littérature

3 Chen JA et al. The emerging picture of autism spectrum disorder: genetics and pathology. *Annu Rev Pathol* 2015;10:111-44.

6 Bartlett DW, Clough JM, Godwin JR et al. The strobilurin fungicides. *Pest Manag Sci* 2002;58:649-62.

8 Tanner CM, Kamel F, Ross GW et al. Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. *Environ Health Perspect* 2011;119:866-72.

Autres publications identifiées

Sealey LA et al. Environmental factors in the development of autism spectrum disorders. *Environ Int* 2016;88:288-98.
Cette revue fait le point sur les données scientifiques permettant d'établir un lien de causalité entre plusieurs facteurs environnementaux et les troubles autistiques. Ceux-ci comprennent les pesticides, les phtalates, les biphényles polychlorés, les solvants, les polluants atmosphériques, les parfums, le glyphosate et les métaux lourds, en particulier l'aluminium utilisé dans les vaccins comme adjuvant. Les humains sont quotidiennement exposés à ces différentes substances toxiques puisqu'elles sont présentes dans les cosmétiques et les herbicides.

Matelski L et al. Risk factors in autism: Thinking outside the brain. *J Autoimmun* 2016;67:1-7.
Dans cette revue, les auteurs présentent l'état des connaissances concernant les facteurs de risque contribuant aux troubles du spectre autistique dont l'étiologie est mixte et multifactorielle. L'implication des facteurs environnementaux et les interactions gènes-environnement sont abordées.

Chen P et al. Metals and Neurodegeneration. *F1000 Res* 2016;5.

Dans cette revue, les auteurs récapitulent les résultats des études épidémiologiques et cliniques afin de faire le point sur le rôle de l'exposition aux métaux dans la survenue des maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer, la sclérose latérale amyotrophique, les troubles du spectre autistique, la maladie de Guillain-Barré, le syndrome de la guerre du Golfe, la maladie de Huntington, la sclérose en plaques, la maladie de Parkinson et la maladie de Wilson.

Liens d'intérêts :

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

Exposition des professionnels médicaux aux rayonnements ionisants et risque de cancer

Helene BAYSSON | **helene.baysson@irsn.fr**

IRSN - Laboratoire d'épidémiologie – Fontenay-aux-Roses

Mots clés : **Cancers, radiologues, rayonnements ionisants, santé-travail**

Les expositions aux rayonnements ionisants (RI) à forte dose ont été reconnues comme facteur de risque de cancers (1). Les effets à long terme des rayonnements ionisants à faibles et moyennes doses restent débattus. De nombreuses études épidémiologiques portant sur le suivi des survivants des bombardements d'Hiroshima et de Nagasaki et sur le suivi des travailleurs exposés aux RI ont montré des augmentations de risque de cancer et de pathologies cardiovasculaires (2). Les professionnels de santé, notamment les radiologues, ont été les premières populations de travailleurs étudiées en raison des fortes expositions professionnelles qui prévalaient de la fin des années 1890 au début du XXème siècle. Suite à la mise en place du système de radioprotection, les doses reçues ont considérablement diminué, passant de 100 mSv par an au début du XXème siècle à moins de 5 mSv par an dans les années 1980 chez les manipulateurs de radiologie (3). Au cours des trente dernières années, le développement rapide de nouvelles techniques d'imagerie diagnostique, interventionnelle et scintigraphique, utilisant des RI, a entrainé une nouvelle augmentation de l'exposition aux RI chez certains professionnels de santé. Si ces nouvelles techniques permettent un bénéfice médical certain pour les patients, il est nécessaire d'évaluer l'impact de ces expositions chroniques sur les personnels médicaux exposés aux RI qui constituent une part importante de l'ensemble des travailleurs exposés aux RI (63 % des travailleurs français en 2013) (4). Dans ce contexte, deux articles ont été publiés récemment : l'un porte sur une étude américaine évaluant le risque de cancer chez les manipulateurs de radiologie effectuant des procédures interventionnelles guidées par fluoroscopie ; l'autre porte sur l'association entre exposition aux RI et incidence de cancers chez les personnels médicaux chinois exposés aux RI.

Risques de cancers chez les manipulateurs de radiologie effectuant des procédures interventionnelles guidées par fluoroscopie

Rajamaran P. et al. (2016). Cancer risks in U.S. radiologic technologists working with fluoroscopy guided interventional procedures. Am J Roentgenol. Vol. 206(5): p.1101-8.

Résumé

L'objectif de cette étude menée aux Etats Unis est d'évaluer l'incidence et la mortalité par cancer chez les manipulateurs de radiologie qui effectuent des procédures interventionnelles guidées par fluoroscopie. Les données sont issues de la cohorte américaine des manipulateurs de radiologie (5). Cette cohorte a été mise en place en trois étapes au début des années 1980 aux Etats-Unis, avec une période d'exposition de 1926 à 1982 et une période de suivi allant de 1926 à 2008. Trois auto-questionnaires ont été distribués entre 1980 et 2005, permettant la participation de 90 957 manipulateurs de radiologie en 1998 et 63 482 manipulateurs en 2005. Différentes études épidémio-logiques ont porté sur l'incidence et la mortalité cardiovasculaire et par cancers de cette cohorte, en comparant la population de cette cohorte à la population générale ainsi que des comparaisons internes au sein de la cohorte. Dans cet article, les auteurs s'intéressent à la survenue de cancers et à la mortalité par cancers chez les manipulateurs de radiologie qui ont réalisés des procédures interventionnelles guidées par fluoroscopie au cours de leur carrière professionnelle par rapport à ceux qui n'en ont pas fait. L'historique professionnel est retracé à travers le deuxième auto-questionnaire pour trois périodes (avant 1980, 1980-1989, et après 1990). Un manipulateur de radiologie est classé dans le groupe « exposés » s'il a déclaré avoir effectué des procédures interventionnelles guidées par fluoroscopie au cours d'une de ces trois périodes. Un manipulateur de radiologie est classé dans le groupe « non-exposés » s'il n'a jamais effectué de procédures interventionnelles guidées par fluoroscopie. La fréquence d'utilisation de la fluoroscopie est prise en compte en quatre catégories : jamais ou rarement, une fois par mois, une fois par semaine, tous les jours. L'incidence de cancers est évaluée par le troisième auto-questionnaire (2003-2005), la mortalité par cancer est évaluée jusqu'au 31/12/2008. Les Hazards Ratios (HR)* sont calculés par modèle de Cox avec ajustement sur des facteurs de confusion potentiels (tabagisme, alcoolisme, niveau d'éducation). Les auteurs observent un doublement du risque de décès par cancer du cerveau (HR = 2,55 ; intervalle de confiance à 95 % ($IC_{95\%}$): 1,48,-4,40) chez les manipulateurs de radiologie « exposés » comparativement aux « non-exposés ». Le risque de décès par cancers (toutes localisations confondues, à l'exclusion des cancers de la peau non-mélanomateux) n'était pas plus élevé chez les exposés comparativement aux non-exposés (HR = 1,00 ; $IC_{95\%}$: 0,88-1,14). En prenant en compte l'incidence, les auteurs observent un faible excès de risque de cancers toutes localisations confondues (HR = 1,08 ; $IC_{95\%}$: 1,00-1,17), un excès de risque de mélanome (HR = 1,30 ; $IC_{95\%}$: 1,05-1,61), et un excès de risque de cancers du sein (HR = 1,16 ; $IC_{95\%}$: 1,02-1,32).

Les auteurs concluent que les excès de risques observés chez les manipulateurs de radiologie qui effectuent des procédures interventionnelles guidées par fluoroscopie peuvent être dus aux expositions aux rayonnements ioni-

sants. Cependant, ils ne peuvent exclure la possibilité d'un aléa statistique ou d'un biais de confusion résiduel.

Commentaire

Les auteurs observent un doublement du risque de décès par cancer du cerveau chez les manipulateurs de radiologie qui effectuent des procédures interventionnelles guidées par fluoroscopie et des augmentations de risque d'incidence de cancer du sein et de mélanome. Les points forts de cette cohorte sont l'effectif important et la possibilité d'ajustement sur un certain nombre de facteurs de risque. Les points faibles sont le recueil par auto-questionnaires des données d'exposition et l'absence de données dosimétriques individuelles. Les cas de cancers incidents sont issus des déclarations des travailleurs et n'ont pas pu été validés par des données de registres, et des erreurs de classement ne sont pas exclues. La période d'exposition est ancienne : elle s'étend de 1926 à 1982. Une suspicion d'augmentation du risque de tumeurs cérébrales chez les cardiologues interventionnels avait déjà été rapportée (5). Une revue des cas déclarés chez des cardiologues interventionnels au cours des 20 dernières années identifiait 31 cas de tumeurs avec une durée d'exposition de 23,6 ans et une période de latence entre douze et trente-deux ans. La latéralisation des tumeurs à gauche suggérait une relation possible avec l'exposition professionnelle aux RI. Cependant, ce rapport de cas isolés n'avait pas été, jusqu'à présent, confirmé ou infirmé par des études épidémiologiques présentant une méthodologie adaptée à la problématique. Le sein est un des organes les plus radiosensibles et plusieurs études épidémiologiques ont déjà montré de manière consistante une relation significative entre le risque de cancer du sein et l'exposition aux rayonnements ionisants.

Incidence de cancers solides chez les travailleurs médicaux chinois utilisant les rayons X à but diagnostic : estimation des risques induits par l'exposition aux rayonnements ionisants.

Sun Z. et al. (2016). Solid cancer incidence among Chinese medical diagnostic X-ray workers, 1950-1995: estimation of radiation-related risks. Int Journal of Cancer, vol. 138: p. 2875-2883

Résumé

L'étude chinoise des travailleurs médicaux consiste d'une part en une cohorte de 27 011 travailleurs médicaux exposés aux rayonnements ionisants (radiologistes et manipulateurs de radiologie) qui ont été employés entre le 01/01/1950 et le 31/12/1980 dans les hôpitaux principaux de 24 provinces de Chine et d'autre part en une cohorte de 25 782 travailleurs médicaux non-exposés aux rayonnements ionisants et employés dans les mêmes hôpitaux et pendant la même période. Cette étude a pour objectif d'évaluer la survenue de cancers chez les travailleurs exposés par rapport aux travailleurs non exposés et d'estimer la relation entre le risque de cancer et l'exposition aux rayonnements ionisants. La date de point du suivi est fixée au 31/12/1995, pour un total de 683 425 personnes années (moyenne de suivi de 25,7 années) pour les travailleurs exposés et de 762 950 personnes-années (moyenne de suivi de 29,6 années) pour les travailleurs non-exposés. L'exposition aux rayonnements ionisants a été reconstituée à partir de mesures simulées en fonction de différentes machines, de différents lieux et conditions de travail, des mesures de radioprotection existantes. Une estimation individuelle de la dose annuelle absorbée au colon a été calculée. Les cas de cancers sont identifiés à travers les dossiers médicaux, la confirmation histologique est connue pour 70% des cas de cancers incidents. Des régressions de Poisson sont utilisées afin d'estimer les excès de risques relatifs de cancers dans la population des travailleurs exposés en comparaison de celle des travailleurs non-exposés. Les modèles statistiques de risque ont été ajustés sur l'âge, le sexe, l'année d'embauche, l'âge à l'embauche, l'âge au diagnostic et la période calendaire. Un temps de latence de cinq ans a été pris en compte entre l'exposition et la survenue de cancers.

Parmi les 52 793 travailleurs suivis de 1950 à 1995, 1 643 cas de cancers solides sont survenus dont 795 chez les « exposés » et 848 chez les « non-exposés ». A la date du point de suivie (31/12/1995), 95 % des travailleurs sont vivants. La dose moyenne cumulée au côlon est de 0,086 Gy pour l'ensemble des travailleurs « exposés », elle est de 0,583 Gy pour les travailleurs ayant commencé à travailler en 1949 ou avant, elle est de 0,024 Gy pour les travailleurs ayant commencé à travailler en 1975 ou après. Les résultats montrent une association significative entre l'incidence de cancers solides et la dose annuelle estimée au côlon. L'excès de risque relatif par Gray est de 0,87 (intervalle de confiance à 95 % : 0,48-1,45). Les auteurs estiment que 19,8 % des cancers solides sont liés à l'exposition aux radiations ionisantes. La fraction attribuable varie de 42 % pour les travailleurs employés avant 1955 à 1,1% pour ceux qui ont été employés après 1975. Les auteurs concluent que leurs résultats sont cohérents avec ceux retrouvés dans d'autres études portant sur les travailleurs du nucléaire.

Commentaire

Cette analyse présente une mise à jour du suivi des travailleurs médicaux chinois, exposés et non exposés aux rayonnements ionisants (6,7). La population d'étude présente l'avantage d'avoir un nombre élevé de travailleurs suivis sur une longue période, d'inclure un groupe témoin de travailleurs « non-exposés » employés dans les mêmes hôpitaux (ce qui permet de s'affranchir de l'« effet travailleur sain »), d'avoir une durée de suivi longue et d'avoir des données d'incidence de cancers et non seulement des données de mortalité.

Les résultats antérieurs de cette étude avaient montré des risques plus élevés de cancers solides (sein, œsophage, foie, poumon et vessie) et de leucémies [8]. Une limite importante était l'absence d'estimation de la dose individuelle, l'enregistrement individuel des doses n'a commencé qu'en 1985. Pour remédier à cette limite, une estimation des doses reçues a été effectuée pour la période 1949 jusqu'en 1995. Néanmoins il existe des incertitudes autour de l'estimation de la dose (les modèles mathématiques utilisés pour la reconstruction de dose est basé sur l'historique professionnel d'un échantillon de 14 % de travailleurs) et cette incertitude n'est pas prise en compte dans les modèles d'excès de risques relatifs utilisés par les auteurs. En outre, seule la dose au colon a été utilisée. Par ailleurs, le suivi en termes de cancers n'est pas basé sur des registres

de cancers et l'exhaustivité des cas n'est pas assurée. 30 % des cas de cancers pris en compte n'ont pas de vérification histologique. Il peut exister des différences de niveau socio-économique entre le groupe « exposés » et le groupe « non exposés » constitué principalement de médecins. En dépit de ces limites méthodologiques, les auteurs concluent que leurs résultats sont cohérents avec ceux observés dans d'autres études épidémiologiques portant sur les travailleurs du nucléaire exposés aux rayonnements ionisants. On peut regretter que leurs résultats ne soient pas comparés à d'autres études portant sur les travailleurs médicaux (8).

Conclusion générale

Ces deux études analysées sont en faveur d'un excès de risque de cancer chez les professionnels de santé exposés aux rayonnements ionisants. Dans l'étude menée aux Etats-Unis, les auteurs observent un doublement du risque de décès par cancer du cerveau chez les manipulateurs de radiologie qui effectuent des procédures interventionnelles guidées par fluoroscopie. Une suspicion d'augmentation de l'incidence des tumeurs cérébrales chez les cardiologues interventionnels avait déjà été observée mais ce rapport de cas isolés n'avait pas été, jusqu'à présent, confirmé ou infirmé par des études épidémiologiques présentant un design adapté à la problématique. Dans l'étude menée en Chine, les auteurs montrent une association significative entre l'incidence de cancers solides chez les travailleurs médicaux et l'exposition aux rayonnements ionisants. Les auteurs concluent que l'estimation de l'excès de risque observé est cohérente avec celles d'autres études portant sur les travailleurs du nucléaire. Les points forts de ces études sont leur large effectif et leur durée de suivi importante. La limite majeure de ces deux études est l'absence de données dosimétriques individuelles, même si celles–ci ont pu être estimées à partir d'un modèle mathématique dans l'étude chinoise.

Dans ces deux études, la période d'exposition retenue est ancienne et les doses sont plus élevées que celles observées actuellement. Cependant, les résultats obtenus confortent la nécessité de poursuivre le suivi de ces professionnels, notamment pour des populations spécifiques (médecins interventionnels, personnel de médecine nucléaire) et justifient l'utilisation de mesures de radioprotection mises en place au cours du temps.

General conclusion

Both studies analysed were in favour of an excess risk of cancer among health professionals exposed to ionizing radiation. In the study carried out in the United States, the authors observed a double risk increase of brain cancer deaths in radiologic technologists who perform fluoroscopically guided interventional procedures. A suspected increase in the incidence of brain tumors in interventional cardiologists had already been reported but this isolated case report had not been so far confirmed by epidemiological studies. In the study conducted in China, the authors showed a significant association between the incidence of solid cancers among medical workers and exposure to ionizing radiation. The authors concluded that the estimated excess risk observed is consistent with those obtained in studies of nuclear workers. The strengths of these studies are their large size and their long duration of follow-up. The major limitation of these studies is the lack of individual dosimetric data, even if, in the Chinese study a dose reconstruction using a mathematical model was performed.

In both studies, the chosen exposure period was ancient and the doses are higher than those observed currently. However, the results confirm the need to continue the dose monitoring for these professionals, especially for specific populations (interventional physicians, nuclear medicine staff) and justify the use of radiation protection measures put in place over time.

Lexique

Hazards Ratios (HR) : ou rapport de risque, exprime le risque relatif estimé sur toute la durée de l'étude et qui tient compte des facteurs de confusion.

Fluoroscopie : désigne une technique d'imagerie médicale qui permet de visualiser les organes et les structures en mouvement et en temps réel. On administre au patient un produit de contraste afin d'améliorer la qualité des images obtenues aux rayons X et reproduites sur le moniteur ou l'écran cathodique

Rayonnement ionisant : rayonnement qui se distingue des autres rayonnements comme ceux de la radio, du micro-onde ou du téléphone portable, par sa capacité à transformer un atome en ion. Ce phénomène représente un danger pour les personnes et l'environnement. C'est pourquoi les personnes qui travaillent avec des rayonnements ionisants (rayons X, rayons Gamma) comme les radiologues ou les personnes opérant dans le secteur nucléaire doivent adopter une série de mesures de protection.

Publications de référence

1 Effects of Ionizing Radiation: UNSCEAR 2006 Report to the General Assembly, with Scientific Annexes. *United Nations Publications*; 2009. 344 p.

2 Preston DL, Shimizu Y, Pierce DA, Suyama A, Mabuchi K. Studies of mortality of atomic bomb survivors. Report 13: Solid cancer and noncancer disease mortality: 1950-1997. *Radiat Res*. 2003 Oct; 160(4):381–407.

3 Simon SL, Weinstock RM, Doody MM, Neton J, Wenzl T, Stewart P, et al. Estimating historical radiation doses to a cohort of U.S. radiologic technologists. *Radiat Res.* 2006 Jul;166(1 Pt 2):174–92.

4 Institut de radioprotection et de sûreté nucléaire (IRSN). La radioprotection des travailleurs en 2012. IRSN; 2013 p. 104. PRP-HOM/2013-008

5 Sigurdson AJ, Doody MM, Rao RS et al. Cancer incidence in the US radiologic technologists health study, 1993-1998, *Cancer*; 2003 : 97 : 3080-3089

6 Roguin A, Goldstein J, Bar O, Goldstein JA. Brain and neck tumors among physicians performing interventional procedures. *Am J Cardiol*. 2013 May 1;111(9):1368–72.

7 Wang JX, Boice JD, Li BX, Zhang JY, Fraumeni JF. Cancer among medical diagnostic x-ray workers in China. *J Natl Cancer Inst*. 1988 May 4;80(5):344–50.

8 Wang JX, Inskip PD, Boice JD, Li BX, Zhang JY, Fraumeni JF. Cancer incidence among medical diagnostic X-ray workers in China, 1950 to 1985. *Int J Cancer J Int Cancer*. 1990 May 15;45(5):889–95.

9 Linet MS, **Kim KP, Miller DL** et al. Historical review of occupational exposures and cancer risks in medical radiation workers. *Radiation Research*, 2010:793-808

Liens d'intérêts :

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

Impact des polluants persistants sur la différenciation des cellules souches embryonnaires et intestinales adultes

Benoit MIOTTO et Nadège GUINOT | **benoit.miotto@inserm.fr**

Inserm U1016, CNRS UMR8104, Univ. Paris Descartes - Institut Cochin - Paris

Mots clés : **Cellules souches, différenciation cellulaire, épigénétique, pluripotence, polluants persistants**

L'exposition aux polluants de l'environnement est un problème majeur de santé publique. De nombreuses molécules font ainsi l'objet de surveillance par les organismes de santé du fait de conséquences, supposées ou avérées, sur l'organisme. La dioxine présente dans la fumée de cigarette ou des gaz d'échappements des véhicules, est classée comme substance cancérogène par l'organisation mondiale de la santé. De nombreuses publications ont mis en avant les conséquences de l'exposition à la dioxine sur la santé humaine, et la différenciation cellulaire, notamment des cellules souches (1-3). La propagation, le renouvellement et la différenciation des cellules souches est très finement régulé. Les cellules souches, contrairement aux autres cellules de l'organisme, ont la capacité de se renouveler 'virtuellement' à l'infini, et de pouvoir se différencier, dans un environnement approprié, en tout type cellulaire.

Les deux articles sélectionnés dans cette note étudient l'effet de l'activation du récepteur aux hydrocarbures aromatiques AHR* sur la capacité de différenciation de cellules souches embryonnaires *in vitro*, et sur les cellules souches de l'épithélium intestinal chez la souris adulte. Dans ces deux cas (*in vivo* et *in vitro*), la modulation de l'activité d'AHR conduit à une altération de la différenciation des cellules. Le rôle régulateur de la dioxine serait dû à une altération de l'expression de certains gènes associés au caractère 'souche'.

Ces deux études mettent donc une nouvelle fois en avant l'effet toxique de la dioxine, et propose un rôle direct de cette dernière, via son récepteur AHR, sur la fonction des cellules souches embryonnaires et intestinales adultes.

Le récepteur aux xénobiotiques AHR contrôle la différenciation des cellules souches embryonnaires humaines en liant une séquence répétée de type Alu

Morales-Hernandez A. et al. (2016). Alu retrotransposons promote differentiation of human carcinoma cells through the aryl hydrocarbon receptor. Nucleic Acids Res, vol. 44: p.4665-83.

Résumé

Les séquences Alu* sont très abondantes dans le génome humain (10 % de la taille du génome) et pourraient être impliquées dans le contrôle de l'expression génique en créant des sites de liaison pour facteurs de transcription (4). L'équipe dirigée par Dr Fernandez-Salguero démontre, dans deux types de cellules souches embryonnaires humaines (H9 et NTERA), que le récepteur AHR* contrôle la différenciation cellulaire en se liant à une de ces séquences Alu présente en amont du promoteur du gène de pluripotence NANOG.

Les auteurs montrent que lors de la différenciation des cellules souches induite en présence d'acide rétinoïque, l'expression d'AHR augmente et que la protéine s'accumule dans le noyau. L'inactivation d'AHR par interférence à l'ARN perturbe la différenciation. Ainsi, à l'inverse des cellules contrôles, les cellules inactivées pour AHR restent bloquées à un stade précoce de différenciation, avec une expression élevée des marqueurs de pluripotence OCT4 et NANOG. Ces données démontrent la fonction essentielle d'AHR dans la différenciation des cellules souches, et confirment les données d'autres laboratoires.

Les auteurs ont ensuite analysé de manière plus précise la séquence ADN des régions promotrices des gènes NANOG et OCT4. Ils ont ainsi identifié des séquences Alu contenant un motif de liaison à AHR, prédit *in silico*, en amont des promoteurs des deux gènes. Ils ont par la suite confirmé la liaison d'AHR à ces motifs *in vivo* par une expérience d'immuno-précipitation de la chromatine au cours de la différenciation.

Une étude complémentaire démontre que des ARN non-codants sont produits à partir de ces séquences Alu, appelés respectivement NANOG-Alu et OCT4-Alu, et que leur expression augmente au cours de la différenciation. L'inactivation d'AHR inhibe l'expression de NANOG-Alu et OCT4-Alu au cours de la différenciation, indiquant que ces deux ARN jouent un rôle déterminant dans la différenciation. Les auteurs ont alors exprimé ces ARN dans les cellules et observé que l'expression de NANOG-Alu est suffisante pour inhiber l'expression aussi bien d'OCT4 que de NANOG, sans toutefois affecter l'expression d'autres gènes de pluripotence. Ils en concluent que la liaison d'AHR à la séquence NANOG-Alu, conduirait à la production d'un ARN non-codant au cours de la différenciation qui serait nécessaire à l'extinction de l'expression des gènes NANOG et OCT4. Pour valider cette interprétation, les auteurs finissent par démontrer que l'ARN produit à partir NANOG-Alu est pris en charge par la machinerie de l'interférence à l'ARN, et qu'il contient des séquences d'ADN complémentaires des régions 3'-UTR des ARN messagers de NANOG et OCT4. Cet ARN non-codant produit en amont du promoteur de NANOG est donc bien nécessaire à l'extinction de NANOG et OCT4.

L'ensemble indique que le récepteur AHR affecte la différenciation des cellules souches en modulant l'expression d'un ARN non-codant produit à partir d'une séquence répétée du génome.

Commentaire

Les auteurs montrent de manière élégante, que l'activation du récepteur AHR au cours de la différenciation des cellules souches embryonnaires, régule l'expression de certains gènes clés de la pluripotence, NANOG et OCT4. De manière surprenante, cette régulation est indirecte. AHR se lie au niveau d'une séquence répétée du génome appelée Alu (situé en amont du promoteur du gène NANOG) pour induire la production d'un ARN non-codant, qui en retour interfère avec la production des ARN messagers de NANOG et OCT4. Ce travail décrit une nouvelle fonction du récepteur AHR sur la 'face cachée' du génome : les séquences répétées. De nombreuses analyses de transcriptomes de cellules exposées à une variété de polluants ont été réalisées ces dernières années. Au vu de l'abondance des séquences répétées dans le génome humain, ce travail suggère qu'une ré-analyse de ces données pourrait identifier de nouvelles cibles transcriptionnelles et de nouveaux modes d'action de certains polluants. Il s'agit donc d'une étude importante qui mérite d'être complétée par des analyses en systèmes plus complexes, tel l'animal ou l'humain, et étendue à d'autres types cellulaires. La dérégulation de l'expression de gènes non-codants pourrait être une marque précoce des conséquences de l'exposition à certains polluants de l'environnement sur l'organisme, et à l'origine de la susceptibilité accrue à certaines maladies, comme le cancer.

L'activation de AhR par ses ligands (la 6-formylindolo[3,2-b]carbazole et la 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxine) bloque la différenciation de l'épithélium intestinal

Park JH. et al. (2016). AhR activation by 6-formylindolo [3,2-b]carbazole and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin inhibit the development of mouse intestinal epithelial cells. Environ Toxicol Pharmacol, vol. 43: p. 44-53.

Résumé

Les cellules épithéliales de l'intestin jouent un rôle de barrière entre l'organisme et l'environnement extérieur. Ces cellules proviennent de la différenciation de cellules souches localisées dans la crypte* des repliements de l'épithélium intestinal (5). L'équipe de Dr. Jeong montre que l'exposition de souris à deux ligands d'AhR, la 6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ*) et la 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD*), bloque la différenciation de l'épithélium intestinal, en activant la signalisation médiée par AhR.

Dans une première expérience, les auteurs montrent que le récepteur AhR est fortement exprimé dans les cellules souches de la crypte, identifié par l'expression du marqueur Lgr5. Ce marqueur permet ensuite aux auteurs d'isoler les cellules souches de l'épithélium (Lgr5 positive), de les maintenir en culture *in vitro* et d'induire la formation d'organoïdes en sept jours. La formation de ces organoïdes récapitule en partie le développement de l'épithélium intestinal. L'ajout de FICZ ou de TCDD bloque la formation des organoïdes, le FICZ ayant un effet délétère plus important que le TCDD, à des concentrations similaires. Les auteurs testent alors l'effet du FICZ sur l'intestin de souris adulte, en l'administrant par gavage. Après 10 jours, les souris sont sacrifiées et une analyse cytologique des cryptes de l'intestin et du colon est réalisée. Au niveau de l'intestin, le nombre de cryptes est diminué chez les souris exposées à FICZ (12,5 +/-1,5) par rapport aux souris non gavées (15,2 +/-1,3). La profondeur des cryptes est aussi réduite (85 +/-5μM) comparée aux souris contrôles (103,9 +/-9 μM). Au niveau du colon, la profondeur des cryptes est aussi significativement réduite chez les souris exposées au FICZ. L'ensemble des données démontre que l'exposition au FICZ bloque la différenciation des cellules souches de l'intestin, *in vitro* et *in vivo*.

Les auteurs confirment l'effet délétère de FICZ sur la différenciation en démontrant une altération de l'expression de certains gènes de la différenciation, aussi bien dans les organoïdes que dans l'intestin adulte de souris.

Commentaire

Les résultats obtenus confirment ce qui a été précédemment observés pour d'autres types de cellules souches, que l'activation de la signalisation AhR par ses ligands bloque la différenciation cellulaire. Ces résultats sont toutefois très importants puisqu'ils démontrent de manière exhaustive les conséquences de l'exposition au FICZ (6-formylindolo[3,2-b]carbazole) sur la différenciation de l'épithélium intestinal adulte et la différenciation des cellules 'souches' Lgr5 *in vitro*. Ce résultat pourrait apporter de nouvelles pistes de réflexion pour expliquer des données antérieures montrant un lien entre FICZ et l'inflammation du colon chez l'homme (6). En perturbant le renouvellement des cellules de la paroi de l'intestin et du colon, FICZ pourrait perturber l'équilibre de la flore bactérienne ou encore les défenses immunitaires de l'organisme, conduisant à une inflammation chronique propice à l'émergence de cancer.

Conclusion générale

Les deux études apportent des arguments supplémentaires suggérant un effet néfaste de la dioxine, et des ligands d'AHR, sur la capacité de différenciation des cellules souches embryonnaires et adultes. Les deux études offrent un nouveau regard sur la signalisation AHR dans le contrôle de l'expression des gènes, en particulier des ARN non-codants. Ces études invitent d'ailleurs à une réévaluation de données antérieures. D'une part, l'effet des ligands d'AHR sur l'expression des séquences répétées du génome pourrait offrir de nou-velles perspectives pour évaluer les conséquences biolo-giques de l'environnement sur l'organisme, pour expli-quer la susceptibilité au cancer ou, au contraire, pour contrer la fonction des cellules souches cancé-reuses. D'autre part, l'activation d'AHR en bloquant le renouvel-lement de cellules endommagées (comme montré pour l'intestin) pourrait engendrer l'apparition d'un micro-environnement, pro-inflammatoire, per-mettant l'émergence de cancer.

General conclusion

Two additional studies indicate that activation of the aryl hydrocarbure receptor (AHR), by its ligands, inhib-its the differentiation of stem cells. Activation of AHR activity in human embryonic stem cells and in murine stem cells from the adult intestinal crypt altter the proper extinction of 'stemness' transcription factors during differentiation. These new findings prompt re-evaluation of previous transcriptomic analysis of cells exposed to various pollutants. On the one hand, non-coding RNA produced from repeated DNA repeats might offer new avenues to detect and to evaluate the deleterious effects of pollutants from the environment on tissues and organisms, and some might be markers of the emergence of cancer. On the other hand, by blocking the capacity of stem cells to replace damaged cells, AHR signaling activation, might promote a mi-cro-environment that could favor the emergence of cancer.

Lexique

AHR : facteur de transcription, communément appelé ré-cepteur aux hydrocarbures aromatiques, qui est activé par différents types de xénobiotiques. On l'écrit AHR pour l'humain ; AhR chez la souris

ARN non codant : ARN non traduit en protéine par les ribosomes.

Cellule souche : cellule indifférenciée, se maintenant indéfi-niment en culture, et pouvant se différencier en cellule spécialisée. Les cellules souches totipotentes peuvent géné-rer tout type cellulaire, alors que les cellules souches pluri-potentes peuvent donner tous les types cellulaires à l'exception des annexes embryonnaires. On en trouve au stade précoce du développement (cellule souche embryon-naire) et dans les tissus adultes, où elle joue un rôle de maintien de l'intégrité tissulaire.

Crypte intestinale: localisée entre deux villosités de l'intestin, elle est constituée de plusieurs types cellulaires, les cellules souches étant localisées à l'extrémité la plus éloignée de la lumière de l'intestin. Ces cellules souches permettent le remplacement au cours de la vie adulte des cellules intestinales détruites.

Dioxine : la 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine ou TCDD appartient à la famille des polychlorodibenzo-p-dioxines. C'est la mmolécule la plus toxique de la famille pour l'Homme et classée comme molécule cancérigène.

FICZ : FICZ (ou 6-Formylindolo(3,2-b)carbazole) : agoniste du récepteur AHR. Il s'agit du composé connu ayant la plus forte affinité pour le récepteur AHR.

Gènes ou facteurs de pluripotence : Il s'agit de l'ensemble des gènes nécessaires et suffisants pour permettre à une cellule de se renouveler à l'infini en culture et de se diffé-rencier en tous les types cellulaires. Un prix Nobel, attribué conjointement au Dr Gurdon et Dr Yamanaka, a popularisé certains de ces gènes : Nanog, Oct4, Sox2, Klf4 et c-Myc.

Séquence Alu : les SINE (short interspersed nuclear ele-ments) sont des petites séquences d'ADN (environ 300bp) ayant envahi au cours de l'évolution les génomes de mam-mifères. Les séquences Alu représentent la majorité de ces éléments SINE. Il en existe plus d'un million de copies dans le génome humain. Leur fonction reste énigmatique même si plusieurs études suggèrent une implication dans le con-trôle de l'expression des gènes ou l'organisation fonction-nelle du génome

Publications de référence

1 Wang Y, Fan Y, Puga A. Dioxin exposure disrupts the differentiation of mouse embryonic stem cells into cardio-myocytes. *Toxicol Sci.* 2010 ; 115 (1):225-37.

2 Neri T, Merico V, Fiordaliso F, et al. The differentiation of cardiomyocytes from mouse embryonic stem cells is altered by dioxin. *Toxicol Lett.* 2011 ; 202 (3):226-36.

3 Ahrenhoerster LS, Tate ER, Lakatos PA, et al. Develop-mental exposure to 2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-p-dioxin attenuates capacity of hematopoietic stem cells to undergo lymphocyte differentiation. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2014 ; 277 (2):172-82.

4 Pandey R, Mukerji M. From 'JUNK' to just unexplored noncoding knowledge: the case of transcribed Alus. *Brief Funct Genomics*. 2011 ; 10 (5):294-311.

5 Henning SJ, von Furstenberg RJ. GI stem cells - new in-sights into roles in physiology and pathophysiology. *J Phys-iol*. 2016 [Epub ahead of print]

6 Monteleone I, Rizzo A, Sarra M, et al. Aryl hydrocarbon receptor-induced signals up-regulate IL-22 production and inhibit inflammation in the gastrointestinal tract. *Gastroen-terology*. 2011 ; 141(1):237-48

Revues de la littérature

Wang Q, Kurita H, Carreira V, et al. Ah Receptor activation by dioxin disrupts Activin, BMP, and WNT signals during the

early differentiation of mouse embryonic stem cells and inhibits cardiomyocyte functions. *Toxicol Sci*. 2016 149(2):346-57.

Kim HM, Kim JW, Choi Y, et al. Xeno-sensing activity of the aryl hydrocarbon receptor in human pluripotent stem cell-derived hepatocyte-like cells. *Sci Rep*. 2016 ; 6:21684.

Jönsson ME, Mattsson A, Shaik S, et al. Toxicity and cytochrome P450 1A mRNA induction by 6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ) in chicken and Japanese quail embryos. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2016 ; 179:125-36.

Stanford EA, Wang Z, Novikov O, et al. The role of the aryl hydrocarbon receptor in the development of cells with the molecular and functional characteristics of cancer stem-like cells. BMC Biol. 2016 ; 14:20.

Autres publications identifiées

Rentas S, Holzapfel NT, Belew MS, et al. Musashi-2 attenuates AHR signalling to expand human haematopoietic stem cells. *Nature*. 2016 ; 532(7600):508-11.
L'étude démontre le rôle du récepteur AHR dans le contrôle du caractère souche des cellules dérivées du sang de cordon ombilical. L'étude propose que la manipulation de l'activité de AHR pourrait permettre des gains de production de ces cellules souches et d'augmenter leur potentiel régénératif.

Mohammadi-Bardbori A, Akbarizadeh AR, Delju F, et al. Chromatin remodeling by curcumin alters endogenous aryl hydrocarbon receptor signaling. *Chem Biol Interact*. 2016 ; 252:19-27.
L'étude montre dans des lignées de cellules dérivées de tumeurs de patient que l'activité d'AHR et l'expression de sa cible CYP1A1 induite par le FICZ in vitro est fortement modulé par le co-traitement avec la curcumine, un composé naturel. De manière surprenante l'effet biologique de la curcumine n'est pas linéaire en fonction de sa concentration. A faible concentration la curcumine augmente l'expression de CYP1A1 induite par FICZ, alors qu'à fortes concentrations la curcumine bloque l'induction de CYP1A1.

Brantley E, Callero MA, Berardi DE, et al. AhR ligand Aminoflavone inhibits α6-integrin expression and breast cancer sphere-initiating capacity. *Cancer Lett*. 2016 ; 376(1):53-61.
L'étude montre que l'activation de la signalisation AHR, par l'aminoflavone et son dérivé AFP464, dans des cellules de cancer du sein bloque leur capacité à former des 'sphères' in vitro. Cela démontre le pouvoir anti-cancéreux de ces deux molécules, et leur capacité à bloquer, du moins in vitro, la propagation des cellules 'souches' cancéreuses.

Liens d'intérêts :

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

anses
agence nationale de sécurité sanitaire
alimentation, environnement, travail

Connaître, évaluer, protéger

Bulletin de veille Scientifique

Édition scientifique • Bulletin de veille n° 31 • Mars 2017
Notes d'actualité scientifique

Risques sanitaires et société

Pollution de l'air en ville et impact sur la santé de populations vulnérables

Gilles MAIGNANT | **maignant@unice.fr**

CNRS - UMR 912 SESSTIM - Marseille

Mots clés : **Exposition, indicateur, perception, pollution, ville**

La pollution de l'air est au cœur de la problématique urbaine car la ville concentre la plus grande partie de la population et cette tendance va s'accroitre dans les années à venir (en 2014, 79.3% de la population française vit dans les villes). Cette note couple une approche épidémiologique et une approche plus qualitative (sociologique) proposant des méthodes d'appropriation des outils de mesures par le public permettant ainsi une prise de conscience de chacun dans la prise en main de l'amélioration de sa santé. En effet, l'article de Demoulin-Alexikova et al. questionne le rôle de la pollution de l'air et des particules fines (PM_{10}), mais également de la fumée de cigarette, dans la survenue ou l'aggravation de la toux chez l'enfant, tout en s'intéressant aux facteurs de dépendance (âge et sexe). L'article de Radisic et Newbold, quant à lui, questionne l'appropriation d'un indice couplant qualité de l'air et santé par les populations dites à risque en interrogeant les services compétents de la sphère décisionnelle publique.

Impact de la pollution de l'air sur l'augmentation de la sensibilité à la toux des enfants en bonne santé en Slovaquie, étude sur les facteurs sexe et âge

Demoulin-Alexikova S. et al. (2016). Impact of air pollution on age and gender related increase in cough reflex sensitivity of healthy children in Slovakia. Frontiers in Physiology, vol.7: p. 54.

Résumé

L'objectif de cette étude est d'estimer l'impact de l'exposition à la fumée de tabac ambiante (ETS) produite par les parents et l'exposition aux particules fines PM_{10} sur la survenue de toux chez l'enfant en bonne santé (enfant non asthmatique) en différenciant les questions d'âge et de sexe. La toux est le symptôme respiratoire le plus fréquent contribuant à l'utilisation importante de médicaments. Un indicateur de sensibilité à la toux est mis en place (CRS), le reflexe de toux joue un rôle majeur dans la protection du système respiratoire en expulsant les particules étrangères et les substances irritantes inhalées dans l'environnement. Les résultats montrent que les filles exposées à l'ETS ont un indice CRS plus élevé (22.3 µmol/l, IC : [9.8, 50.2]) que les filles non-exposées (79.9 µmol/l, IC : [56.4, 112.2]), mais également comparé à ceux des garçons exposés (121.4 µmol/l, IC : [58.2, 253.1]). De plus la localisation géographique a permis de montrer que les jeunes filles vivant en ville ont un CRS plus élevé que les jeunes filles résidant à la campagne. Le principal résultat de l'étude est que l'effet de l'ETS sur la CRS est sexe-dépendant (femme) et que l'effet des PM_{10} (seule source de pollution importante sur la zone d'étude) sur la CRS est sexe et âge dépendants (femme et âge scolaire). L'étude a porté sur deux années (2007-2008) dans une région du Nord de la Slovaquie, les mesures ont été effectuées dans quatre écoles (deux urbaines : écoles élémentaire et secondaire, et deux situées en zone rurale : écoles élémentaires).

Commentaire

De très nombreuses études s'intéressent au lien entre toux et environnement, mais cette étude a permis d'estimer le potentiel d'influence de la pollution de l'air sur l'augmentation de la sensibilité à la toux (capsaisin). Ce qui fait l'intérêt de cette étude est le couplage d'une méthode par questionnaire (habitude de fumer, lieux de vie) avec des mesures quantitatives (spirométrie, test de sensitivité à la toux : CRS). Des modèles statistiques, type ANOVA* ont été utilisés pour estimer l'effet du lieu de résidence sur la CRS tout en contrôlant les autres facteurs que sont l'âge du groupe et le genre. Les fréquences de paramètres de toux ont été comparées entre les groupes en utilisant une méthode classique (Tests du Chi2 ou test de Fisher dans le cas de petits échantillons). L'apport principal de cet article est que l'augmentation de l'exposition à l'ETS, due à la fumée parentale et l'augmentation de l'exposition aux PM_{10}, liée au lieu de résidence urbaine crée des différences entre les individus avec une aggravation plus forte pour le sexe féminin. Autre apport, les résultats de cette étude, valident d'autres études précliniques antérieures et mettent en exergue le rôle de la fumée ambiante de cigarette dans les changements de plasticité des voies neuronales responsables de la régulation de la toux, conduisant à une sensibilisation centrale et périphérique du réflexe de toux. Ainsi, l'exposition à la fumée doit être considérée comme une cause possible de syndrome d'hypersensibilité de la toux. L'article présente quelques limites qui pourraient être surmontées en allongeant le temps d'exposition et l'intensité à l'ETS. Il serait pertinent de questionner les parents sur le nombre de cigarettes fumées par jour et de savoir depuis combien de temps les enfants sont exposés (naissance ou pas).

Facteurs influençant les fournisseurs de services de santé, et adoption de l'indice de qualité de l'air – santé par les populations dites « à risque » : une étude qualitative

Radisic S. et al. (2016). Factors influencing health care and service providers' and their respective "at risk" populations adoption of the Air Quality Helath Index (AQHI): a qualitative study cess winter morbidity and mortality: do housing and socio-

economic status have an effect? BMC Health Services Research, vol.16 : p. 107-117.

Résumé

L'objectif de cet article est d'étudier comment des indices de qualité de l'air peuvent influencer la connaissance de la pollution de l'air et infléchir des stratégies de réduction de la pollution. La méthodologie mise en œuvre dans cet article est un questionnaire en face à face avec les services de santé (infirmières et éducateurs respiratoires), les fournisseurs de services (éducateurs de l'enfant) et des groupes de discussion (populations à risques, enfants et personnes âgées - agents facilitateurs pour l'acceptation de l'indice) ; questionnaire qui s'appuie sur 50 participants. L'indice AQHI fournit aux usagers des informations sur la qualité de l'air et la santé (4 niveaux de risque : bas (1-3), modéré (4-6), élevé (7-10), très élevé (>10)), pour que ceux-ci puissent modifier leurs comportements le cas échéant (réduction ou changement d'activité en extérieur). Les auteurs s'intéressent aux cinq étapes du processus d'adoption du nouvel indice (connaissance, persuasion, décision, implémentation, confirmation), lors de l'enquête menée auprès des décideurs publics et des personnes vulnérables. L'étude a montré des différences notables de perception de l'indice en fonction des différents quartiers (pollution différenciée) et des statuts socio-économiques des répondants. Par exemple, les séniors résidant dans les quartiers à statuts socio-économiques inférieurs souhaitent une meilleure explication de ce que l'indice peut leur apporter, de même que les parents de jeunes enfants vivant dans ces mêmes quartiers souhaitent une meilleure communication sur la nécessité d'un tel index.

Commentaire

Cette étude, menée au Canada, a montré que l'adoption de l'indice AQHI pourrait être grandement amélioré mais que les moyens pour y parvenir ne sont pas les mêmes pour tous. Par exemple, les services de gardes d'enfants ont préconisé que cette information soit diffusée sur le canal 47 de la télévision (chaine pour les enfants) tandis que les personnes de catégorie socio-économique favorisée et ayant des problèmes respiratoires préconisent que cette information soit disponible toutes les dix minutes (temps réel sur la chaine météo). Certaines personnes n'ont, quant à elles, jamais entendu parler de l'indice (hétérogénéité de connaissances). Tous les usagers sont d'accord pour dire que plus l'indice est à une échelle fine (spatiale et temporelle), plus il a de chances d'être compris et utilisé. Comme toute étude basée sur des enquêtes, elle comporte des limites dans la constitution de l'échantillon: seules les personnes démarchées ont participé à l'enquête, un seul organisme de santé et de services a été contacté, aucun cardiologue ou spécialiste de maladies respiratoires n'a été inclus dans le panel. De même le découpage de l'indice en quatre graduations (faible, modéré, élevé, très élevé) pourrait encore être affiné, même s'il présente déjà l'avantage de préconiser des recommandations pour les deux types de populations (à risques et générale). Nonobstant ces quelques limites, l'article permet de montrer que l'amélioration de la qualité de l'air des villes n'est pas qu'une question technique mais demande également un effort de communication différenciée.

Conclusion générale

La qualité de l'air dans les villes et son estimation (mesures quantitatives) sont assez bien documentées mais l'améliorer est beaucoup plus complexe que de simples mesures car cela relève de différents facteurs (connaissances scientifiques (Demoulin-Alexikova et al.), appropriation par les décideurs, compréhension et acceptation par la population (Radisic et al.), décloisonnement des approches segmentées). Ainsi le rôle de la fumée ambiante de cigarette et des particules fines sur la toux mérite encore d'être approfondi en documentant davantage les enquêtes (lieux et modes de vie). Que ce soit par la mise en place de politiques publiques (aménagement, transport…) ou par la perception de la population à travers un indicateur (AQHI) à une échelle locale ; des efforts de communication, notamment en termes de bénéfices perfectibles sur la santé, restent à faire. En France, par exemple, l'indice ATMO, qui donne la qualité de l'air journalière dans les grandes agglomérations, est très peu communiqué dans les médias (non présent dans les bulletins d'information radio ou télévisuel). Mais les choses vont évoluer. En 2016, l'intégration d'informations de pollution atmosphérique couplées aux bulletins météo est préconisée dans le rapport Roumégas-Saddier (comité d'évaluation et de contrôle des politiques publiques) et devrait donc se généraliser dans les années à venir.

General conclusion

Air quality in cities and its estimation (quantitative measures) are fairly well documented but improve air quality is much more complex than simple measures because under various factors (scientific knowledge (Demoulin-Alexikova et al), ownership by policymakers, understanding and acceptance by the population (Radisic et al.), deregulation of segmented approaches). Thus the role of ambient smoke's cigarette and fine particles on cough still deserves further documenting more inquiries (places and lifestyles). Whether through the implementation of public policies (planning, transport ...) or by the perception of the population through an indicator (AQHI) on a local scale; communication efforts, particularly in terms of perfectible health benefits, are still needed. In France, for example, the ATMO index, which gives the daily air quality in large cities, is quite never announced in the media (not given in to radio or television news bulletins). But things will change. In 2016, the integration of air pollution information coupled with weather updates is recommended in the report Roumégas-Saddier (evaluation committee and control of public policies) and should become widespread in the coming years.

Lexique

ANOVA : analyse de la variance dont le but est de comparer des moyennes de populations, à partir d'échantillons aléatoires et indépendants prélevés dans chacune d'elles.
AQHI : indice de la Qualité de l'air pour la santé (Canada), qui couple des données de pollution de l'air et d'impact sur la santé. L'indice distingue deux catégories de population (à risques, générale) et 4 niveaux de risques : 1-3 (faible), 4-6 (modéré), 7-10 (élevé) et supérieur à 10 (très élevé) ; il propose des recommandations en fonction du niveau de risque et du type de population.
CRS : Caugh reflex sensitivity: sensibilité au réflexe de toux.
Capsaisin : substance chimique, irritante pour l'épithélium de mammifères, ce qui entraine une difficulté à respirer.
ETS : fumée de tabac ambiante (expositions directe et indirecte).
IC : Intervalle de confiance [moyenne - écart type ; moyenne + écart type]
Spirométrie : la spirométrie est l'un des tests de la fonction pulmonaire. Le plus important est la CVF (Capacité Vitale Forcée). Les autres tests de spirométrie sont la CV (Capacité Vitale ou Capacité Vitale Lente) et la VMM (Ventilation Maximale par Minute).

Publications de référence

1 Abelsoh, A, Stieb DM. Effets de la pollution de l'air sur la santé : une approche pour conseiller les patients à l'aide de la cote air santé. *Canadian Family Physician* 2011;57 2
Eilstein D. Prolonged exposure to atmospheric air pollution and mortality from respiratory causes. *Rev Mal Respir* 2009 Dec;26 (10):1146-58.

3 Kummer J. Indoor pollution and health. *Rev Med Brux* 1998 Sep;19 (4):A363-6.

4 Szpiro A, Sheppard L, Adar SD, Kaufman JD. Estimating acute air pollution health effects from cohort study data. *Biometrics* 2014;70 : 164-174.

Revues de la littérature

Obersteiner A, Gilles S, Frank U, et al. Pollen-Associated Microbiome Correlates with Pollution Parameters and the Allergenicity of Pollen. *Plos One* 2016; 11 (2).

Autres publications identifiées

Shirazi S, Kazmi J. Analysis of socio-environmental impacts of the loss of urban trees and vegetation in Lahore, Pakistan: a review of public perception. *Ecological Processes* 2016; 5 (1):1-12.
Cette publication est également intéressante car elle utilise une enquête de perception sur la population. Il s'agit d'estimer le rôle de la disparition d'espaces vers à Lahore et de son impact sur la qualité de vie et la santé en intégrant des facteurs socio-environnementaux.

Lowe K, Mosby K. The conceptual mismatch: A qualitative analysis of transportation costs and stressors for low-income adults. *Transport Policy* 2016; 49:1-8.
Cette publication permet d'aborder les politiques de transport en ville avec son impact sur la santé et le bien être des populations, notamment à travers des expériences de vie d'adultes à faibles revenus. La méthodologie mobilisée est également qualitative à base de questionnaires (52 interviews).

Lavigne E, Yasseen AS, Stieb DM, Hystad P, Van Donkelaar A, Martin RV, Brook JR, Crouse DL, Burnett RT, Chen H, Weichenthal S, Johnson M, Villeneuve PJ, Walker M. Ambient air pollution and adverse birth outcomes: Differences by maternal comorbidities. *Environmental Research* 2016; 148: 457- 466.
Cette publication est intéressante car elle permet d'approfondir les liens entre expositions à la pollution de l'air pendant la grossesse et les complications à la naissance. Elle offre un nouveau regard sur l'exposition tout au long de sa vie (aspect prénatal), en associant d'autres cofacteurs responsables (asthme, diabète).

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-sur-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

Imourana ALASSANE-KPEMBI: Toxalim, Inra, Toulouse

Thomas BAYEUX : Anses, Dir. de l'information, de la communication et du dialogue avec la société

Juliette BLOCH : Anses, Mission alertes et veille sanitaires

Marie-Chantal CANIVENC-LAVIER : Centre des sciences du goût et de l'alimentaiton, Inra-CNRS, Dijon

Delphine CRAPERI: Centre technique du papier, Équipe Hygiène-contact alimentaire, Grenoble

Martine DAUJAT: Inserm U1183, Institut de médecine régénératrice et de biothérapie de Montpellier

Sabine DELANNOY : Anses, Laboratoire de sécurité des aliments, Maisons-Alfort

Céline DELERME : ANSM - Agence nationale de sécurité des médicaments et des produits de santé, Saint-Denis

Alain DUFRESNE : École internationale du papier, de la communication imprimée et des biomatériaux, Grenoble INP Pagora, Saint-Martin d'Hères.

Alban GERVAISE : Inserm, Service d'imagerie médicale, Hôpital d'instruction des armées, Nancy

Denis GERLIER : Centre international de recherche en infectiologie, ENS, Lyon

Barbara GOUGET : Anses, Dir. scientifique des laboratoires, Maisons-Alfort

Zakia HEBIB : Précedemment à l'Anses, Dir. évaluation des produits réglementés, Maisons-Alfort

Véronique MACHELON : Précédemment à l'Inserm

Mostafa OULDELHKIM : ANSM - Agence nationale de sécurité des médicaments et des produits de santé, Saint-Denis

Marie-Odile RAMBOURG : Anses, Dir. évaluation des produits réglementés, Maisons-Alfort

Marie-Hélène ROPERS: Inra, Unité Biopolymères intéractions assemblages, Nantes

Virginie ROUILLER-FABRE: CEA, Laboratoire de développement des gonades, Fontenay-aux-Roses

Catherine VILLARD: CNRS/UPMC/Institut Curie, Paris V

Cécile VERDIER : ANSM - Agence nationale de sécurité des médicaments et des produits de santé, Saint-Denis

Ousmane TRAORE : CHU Gabriel Montpied, Clermont-Ferrand

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 ESTÈVE, 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.

anses

Agence nationale de sécurité sanitaire
de l'alimentation, de l'environnement et du travail
14 rue Pierre et Marie Curie
94701 Maisons-Alfort Cedex
www.anses.fr / @Anses_fr

ISSN 1950-4764 – Dépôt légal : avril 2017 – © Anses Éditions : avril 2017 – Conception : Parimage, Réalisation : Anses – Crédit photo : Fotolia