

Caractérisation du danger des substances à l'aide d'outils biologiques in vitro et in vivo et application à la biosurveillance de l'environnement aquatique

Selim Ait-Aissa, François Brion, Jean-Marc Porcher

▶ **To cite this version:**

Selim Ait-Aissa, François Brion, Jean-Marc Porcher. Caractérisation du danger des substances à l'aide d'outils biologiques in vitro et in vivo et application à la biosurveillance de l'environnement aquatique. Rapport Scientifique INERIS, 2005, 2004-2005, pp.25-27. ineris-01868971

HAL Id: ineris-01868971

https://ineris.hal.science/ineris-01868971

Submitted on 6 Sep 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Caractérisation du danger des substances à l'aide d'outils biologiques *in vitro* et *in vivo* et application à la biosurveillance de l'environnement aquatique

SÉLIM AÏT-AÏSSA, FRANÇOIS BRION, JEAN-MARC PORCHER

Un très grand nombre de substances chimiques issues des activités humaines agricoles, urbaines ou industrielles, est rejeté dans les milieux aquatiques et contribue à une contamination croissante des ressources en eau. Ces polluants sont retrouvés à des concentrations parfois très faibles, ce qui rend difficile leur détection et l'évaluation de leurs impacts. Un des défis actuels en écotoxicologie consiste à développer des outils sensibles qui permettent une évaluation du devenir et des effets des polluants chimiques dans la biosphère. Les outils biologiques basés sur le mécanisme d'action toxique des substances apparaissent particulièrement adaptés pour répondre à ces exigences. À travers l'exemple des polluants perturbateurs endocriniens (PE), nous décrivons ici les outils *in vitro* et *in vivo* mis en place à l'INERIS et leur utilisation combinée pour caractériser le danger des substances, les niveaux de contamination des milieux ainsi que les effets biologiques chez le poisson *in situ*.

Études *in vitro* et *in vivo* des mécanismes d'action des PE

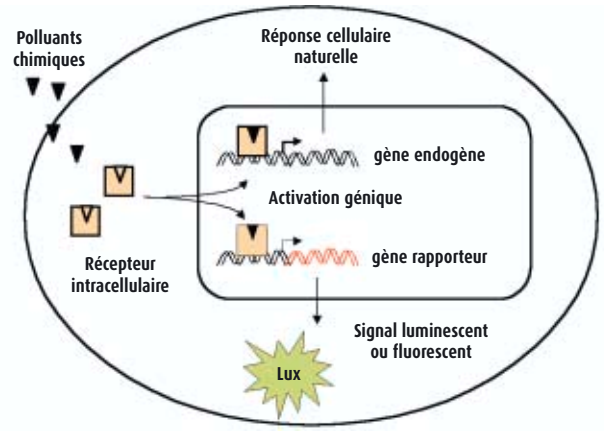
Les perturbateurs endocriniens sont des substances chimiques d'origine naturelle ou anthropique, susceptibles de modifier le fonctionnement du système endocrinien et de provoquer des effets néfastes sur la santé d'un organisme ou de sa descendance. Les PE appartiennent à des classes chimiques diverses (stéroïdes naturels et synthétiques, alkyl phénols, dioxines, pesticides, plastifiants, etc.) et sont présents dans les eaux de surface, les sédiments ou les rejets de stations d'épuration. L'un des mécanismes primaires importants qui initie leur toxicité réside dans leur capacité à se lier aux récepteurs des hormones et à perturber l'expression des gènes médiée par ces récepteurs.

Des modèles cellulaires utilisant des gènes rapporteurs luminescents ou fluorescents ont été développés, en partie en collaboration avec l'unité INSERM 540. Ces tests *in vitro* permettent une mesure simple de la capacité des substances à se lier aux récepteurs nucléaires et à induire/inhiber une réponse génique (Fig. 1). Les récepteurs ciblés dans nos études sont les récepteurs des œstrogènes (ER), des androgènes (AR) et de la dioxine (AhR). Du fait de leur simplicité d'utilisation, ces tests sont tout à fait adaptés au criblage de substances ou d'échantillons environnementaux.

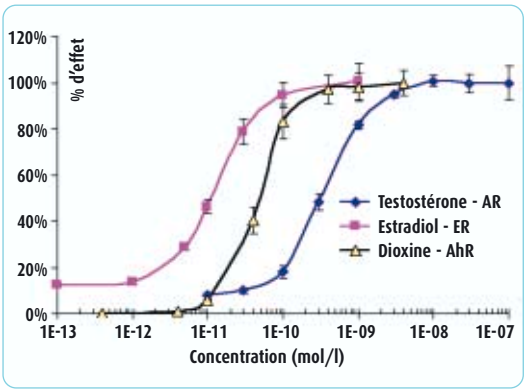
D'autres mécanismes de perturbation endocrinienne sont liés à une altération de certaines enzymes impliquées dans la synthèse des hormones stéroïdiennes. Des systèmes *in vitro* plus ou moins complexes (fractions microsomales de cerveau et d'ovaires de poisson, lignée cellulaire

suite page 26

FIGURE 1.



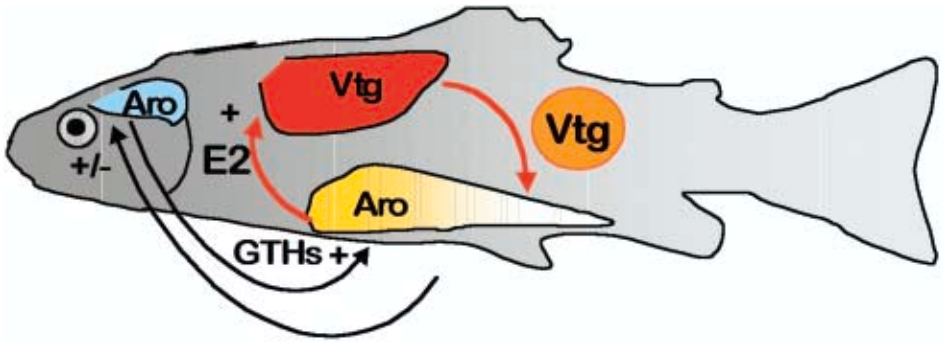
1.A
Principe des tests *in vitro* utilisés pour mesurer l'activité PE des substances ou de mélanges environnementaux.



1.B
Le graphique montre l'effet de l'œstradiol, la testostérone et la dioxine sur l'activation des récepteurs des œstrogènes (ER), des androgènes (AR) et de la dioxine (AhR) respectivement dans les cellules MELN, MDA-kb2 et PLHC-1.

humaine) sont ainsi utilisés pour évaluer l'effet des polluants sur l'activité d'aromatisation des androgènes en œstrogènes (activité P450 aromatase).
Un criblage systématique de 30 pesticides à l'aide des modèles cellulaires a ainsi permis d'identifier des substances capables d'interagir avec différentes cibles moléculaires comme les récepteurs des œstrogènes, des androgènes et de la dioxine et/ou de moduler l'activité aromatase dans les cellules JEG-3 (Laville et al, 2004). Une cinquantaine de substances environnementales de natures diverses (pesticides, métaux, HAPs...) ont également été testées sur microsomes pour leur capacité à inhiber l'activité aromatase de poisson (Brion et al, 2004b). Parmi les produits testés, les pesticides à noyau imidazole (ex. propiconazole, prochloraz, clotrimazole) et le mercure apparaissent les plus actifs dans ce test. Ces résultats montrent que ces polluants sont des PE potentiels via différents mécanismes d'action et soulèvent la question de leurs effets *in vivo*.
In vivo, la mesure de l'expression de gènes et de protéines hormono-régulés permet d'évaluer et de caractériser le potentiel œstrogénique des substances chimiques (Brion et al, 2004a). Il s'agit en particulier d'étudier les effets des polluants sur l'induction d'une protéine hépatique, la vitellogénine (Vtg), et l'expression des cytochromes P450 aromatases (Aro) dans le cerveau et les ovaires qui jouent un rôle prépondérant dans le développement et la reproduction des poissons (Fig. 2). Cette approche *in vivo* permet en outre de prendre en compte des facteurs biologiques importants (métabolisme, bio-accumulation, stade de développement et sexe de l'organisme) dans le cadre de l'évaluation des effets. Des essais en cours menés chez le poisson zèbre ont ainsi permis de confirmer les effets de certaines substances identifiées actives par les essais *in vitro*. C'est le cas, par exemple, d'un fongicide, le clotrimazole, qui est capable de perturber les activités aromatases dans le cerveau et les ovaires du poisson zèbre adulte.

FIGURE 2.



Cibles moléculaires et tissulaires des PE chez le poisson. L'exposition *in vivo* permet de prendre en considération l'effet direct des molécules sur l'expression des gènes au sein des tissus cibles (ex. vitellogénine (Vtg) dans le foie) et/ou leurs effets indirects via une altération de la synthèse des hormones gonadotropes (GTHs) ou stéroïdiennes (œstradiol E2) en modulant par exemple l'activité aromatase (Aro) dans le cerveau et les ovaires.

Évaluation des PE *in situ*

Les outils *in vitro* et *in vivo* développés au laboratoire trouvent également leur application dans la biosurveillance de l'environnement en permettant :
- de caractériser les sources de pollution (e.g. effluents) et le devenir des polluants dans l'eau et les sédiments,
- d'étudier leur biodisponibilité et leurs effets chez les populations de poissons à l'aide de mesures de biomarqueurs. Par exemple, la présence de molécules œstrogéniques au sein de mélanges environnementaux comme des effluents de stations d'épuration ou des extraits organiques d'eaux et de sédiments de rivières a été mise en évidence sur des sites impactés par différents types de pollution : agricole, industrielle et/ou urbaine (Aït-Aïssa et al, 2004 ; Michallet-Ferrier et al, 2004 ; Pillon et al, 2005). Ces effets biologiques sont également retrouvés chez des poissons (chevaine, épinoche) capturés sur les sites étudiés (Brion et al, 2002).

Cette approche bio-analytique est actuellement envisagée à plus large échelle pour le suivi de la qualité de l'eau, notamment dans le cadre du réseau hydrobiologique piscicole en collaboration avec le Conseil Supérieur de la Pêche (CSP). Par ailleurs, si les tests *in vitro* s'avèrent efficaces pour détecter la présence de molécules actives dans les mélanges, ils ne sont pas suffisants pour identifier précisément les polluants responsables des activités mesurées. Dans ce but, l'utilisation conjointe de méthodes de fractionnement d'échantillons ou de concentration bio-spécifique de ces molécules (Pillon et al, 2005) couplées à des méthodes d'analyses physico-chimiques est envisagée.

Conclusion

Les outils biologiques basés sur le mécanisme d'action toxique des substances répondent aux besoins actuels d'évaluation de la contamination des milieux dont le suivi et l'amélioration de la qualité des eaux potables et la préservation des ressources en eau (actions prioritaires du Plan National Santé Environnement et de la Directive cadre sur l'Eau). Leur capacité de criblage et de détection des polluants d'intérêt (éco)toxicologique et de leurs effets sur les écosystèmes en font des outils intéressants tant pour une évaluation du risque a priori des substances (au laboratoire) que pour la biosurveillance de la qualité des milieux aquatiques. ●

UN DES DÉFIS ACTUELS EN ÉCOTOXICOLOGIE CONSISTE À DÉVELOPPER DES OUTILS SENSIBLES QUI PERMETTENT UNE ÉVALUATION DU DEVENIR ET DES EFFETS DES POLLUANTS CHIMIQUES DANS LA BIOSPHÈRE.

Références

■ Aït-Aïssa S., Pillon A., Porcher JM. (2004)
Utilisation de modèles in vitro pour l'étude des substances chimiques et des mélanges complexes : cas des perturbateurs endocriniens.
Rapport INERIS, Septembre 2004.

■ Brion F., Tyler C.R., Palazzi X., Laillet B., Porcher J.M., Garric J. and Flammarion P. (2004a)
Impacts of 17ß estradiol, including environmentally relevant concentrations, on reproduction after exposure during embryo-larval-juvenile- and adult life stages in zebrafish (Danio rerio).
Aquatic Toxicology, 68: 193-217.

■ Brion F., Hinfray N., Laville N., Aït-Aïssa S., Porcher J.M. (2004b)
Assessment of the endocrine disrupting effects of several currently used pesticides using complementary in vitro tests.
CREDO Cluster workshop on ecological relevance of chemically-induced endocrine disruption in wildlife.
University of Exeter, UK, 5-7 July 2004.

■ Brion F., Noury P., Palazzi X., Babut M., Garric J., Tyler C.R., Flammarion P. (2002)
Induced vitellogenin levels and gonadal abnormalities in wild chub (Leuciscus cephalus) sampled in French rivers.
SETAC-EUROPE, Vienne, Autriche, 12-16 Mai 2002.

■ Laville N., Brion F., Palluel O., Balaguer P., Casellas C., Porcher J.M., Aït-Aïssa S. (2004)
In vitro assessment of the estrogenic potency of pesticides by using human MELN cell line and primary cultures of rainbow trout hepatocytes. 14th SETAC Europe Annual Meeting, 18-22 avril 2004, Prague, République tchèque.

■ Michallet-Ferrier P., Aït-Aïssa S., Balaguer P., Dominik J., Haffner G.D., Pardos M. (2004)
Assessment of estrogen (ER) and aryl hydrocarbon receptor (AhR) mediated activities in organic sediment extracts of the Detroit River, using in vitro bioassays based on human MELN and teleost PLHC-1 cell lines. Journal of Great Lakes Research, 30: 82-92.

■ Pillon A., Boussioux AM., Escande A., Aït-Aïssa S., Gomez E., Fenet H., Casellas C., Duchesne MJ., Ruff M., Moras D., Vignon F., Nicolas JC. and Balaguer P. (2005)
Binding of estrogenic compounds to recombinant estrogen receptor alpha : application to environmental analysis.
Environmental Health Perspectives, 113(3): 278-284.