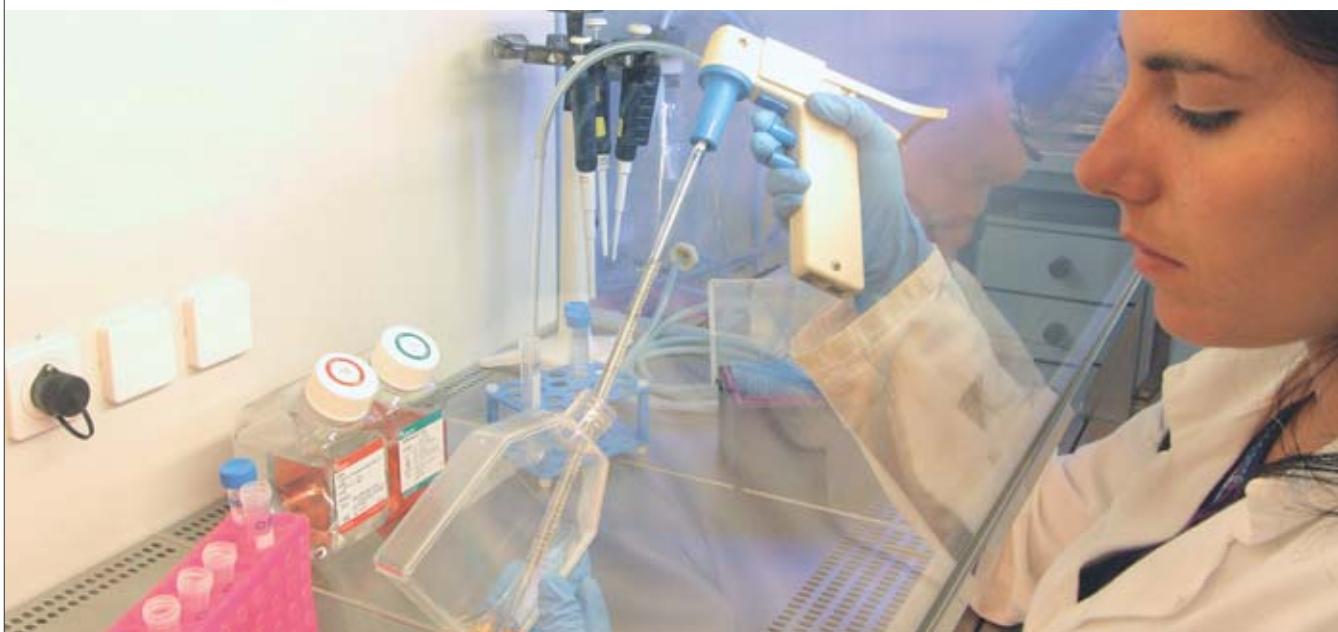


De la toxicologie à l'écotoxicologie

Qu'elle soit minérale, organique ou biologique, **nous vivons par et avec la chimie depuis toujours**. Mais, c'est la révolution industrielle du XIX^e siècle qui offrira un rôle majeur à son industrie, posant d'emblée la **question de l'impact des produits chimiques** sur les opérateurs, les consommateurs et bien sûr l'environnement.



P. Auvian/CEA

Culture de cellules humaines pour des études de toxicologie.

Quelques étapes jalonnent déjà les avancées en matière de protection de la santé et de l'environnement : la limitation de l'expérimentation animale (1959)⁽¹⁾, la directive européenne classant les substances dangereuses (**cancérogènes**, **mutagènes**, toxiques pour la reproduction/CMR) en 1967, la création de l'**Environmental Protection Agency (EPA)** américaine dédiée à la santé humaine et à la sauvegarde des éléments naturels (1970), l'apparition du concept de **chimie verte** dans les années 90. L'année 2007 fut marquée, en France, par le « Grenelle de l'environnement » et pour l'**Union européenne**, par la directive REACH (pour *Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals*) créant un système intégré et unique d'enregistrement, d'évaluation et d'autorisation des substances chimiques. Dans ce contexte, l'**Organisation de coopération et de développement économique (OCDE)** publiait des recommandations pour les tests de produits chimiques incluant la connaissance des propriétés physico-chimiques, de l'**écotoxicologie** et de la **toxicologie**.

La toxicologie et la **radiotoxicologie** bénéficient de l'essor des connaissances scientifiques, techniques et bio-informatiques et du retour d'expérience dans le domaine des médicaments. Dès 2002, le CEA a initié un programme transverse dédié à la toxicologie, visant une meilleure compréhension des impacts d'éléments chimiques et/ou **radionucléides** issus de l'exploitation de l'énergie nucléaire (tritium, iode,

césium, **actinides**) – programme qui inclut, depuis 2010, l'impact des **nanoparticules** sur les **écosystèmes** et le vivant. Ce programme pluridisciplinaire suscite une très forte interaction entre les chimistes et les biologistes du CEA qui veulent comprendre les aspects mécanistiques des toxiques et caractériser leurs formes chimiques.

Les métaux : des toxiques environnementaux

La formation d'espèces assimilables par les organismes reste un aspect clé du transfert de produits toxiques de l'environnement vers le vivant. L'eau, dans laquelle existent des formes **complexées** du métal avec des **ligands** organiques ou inorganiques, constitue pour l'homme un mode direct de contamination **trophique**. Une étude, réalisée par des chimistes et des biologistes du Laboratoire d'étude des protéines cibles (Lepc)⁽²⁾ et le Département radiochimie et procédés (DRCP)⁽³⁾, en collaboration avec

(1) Principe des « 3 R » (« remplacement » par des **modèles informatiques**, « réduction » en maximalisant les informations venant d'un animal et « raffinement » en minimisant la douleur animale) élaboré par les chercheurs britanniques William Russel et Rex Burch.

(2) Laboratoire de l'Institut de biologie environnementale et des biotechnologies (Ibeb/Direction des sciences du vivant) situé sur le centre du CEA à Marcoule.

(3) Département de la Direction de l'énergie nucléaire (DEN), situé sur le centre du CEA à Marcoule.

le **Säteilyturvakeskus (STUK)**, a montré que l'association d'**uranium**, de calcium et de **carbonates** dans des eaux de puits finlandaises, expliquait l'absence d'effet sur la santé de la population. Parallèlement, des études associant l'Institut nanosciences et cryogénie (Inac), l'Institut de recherches en technologies et sciences pour le vivant (IRTSV)⁽⁴⁾ et notamment le Laboratoire de physiologie cellulaire végétale (PCV)⁽⁵⁾, ont montré que le transfert d'uranium des racines vers les parties aériennes des plantes dépend fortement de la forme chimique ou **spéciation** de l'uranium. Néanmoins, quelles que soient les voies de contamination, les espèces métalliques peuvent transiter, depuis un compartiment d'entrée (voies digestives, aériennes, feuilles ou racines des plantes) vers d'autres compartiments (organes de stockages notamment), en franchissant diverses barrières anatomiques et cellulaires. Ces transferts dépendent du mode d'interaction des métaux avec les différents ligands biologiques capables de déplacer successivement le métal à partir de sa forme initiale d'entrée vers des formes éliminables ou stockables. Les études *in vivo* de **biocinétique** et de biodistribution ont permis de déterminer, à l'échelle des organismes vivants, les organes et les compartiments où le métal s'accumule en générant des effets toxiques majeurs : perturbations **métaboliques**, endocriniennes, immunitaires (pour le monde animal) et modifications de la croissance ou du développement racinaire (pour le monde végétal).

Par ailleurs, les chercheurs de l'Ibeb⁽⁶⁾ travaillent sur les mécanismes d'accumulation chez les **bactéries** capables de **réduire** certains **oxydes** métalliques (**sélénite**, **tellurite**, **pertechnétate**, **uranyle**) et de stocker des formes insolubles dans le **cytoplasme** ou, sous forme de **précipités**, au niveau de leur paroi. Depuis une dizaine d'années, les conséquences d'une exposition chronique ou aiguë aux toxiques sont étudiées *in vitro*, via l'utilisation de lignées cellulaires en culture. Si ces approches de type « omique » (**transcriptomique**, **protéomique**, et **métabolomique**) ne remplacent pas l'évaluation *in vivo* (expérimentation animale), en revanche, elles éliminent en amont des molécules à toxicité rédhibitoire.

L'analyse comparative des **transcriptomes** renseigne sur l'activité métabolique de la cellule *via* la modulation de l'expression de **gènes** dans des situations de réponse à des toxiques – approches s'appuyant sur les **puces ADN**. L'analyse comparative de **protéomes** et **métabolomes** de cellules, exposées ou non à des toxiques, requiert l'association de méthodes séparatives, comme l'**électrophorèse**, avec des techniques d'identification par **spectrométrie de masse** des **protéines**. Des approches combinées de métabolomique, de transcriptomique ou de protéomique montrent que l'exposition au cadmium (Cd) entraîne une modulation du métabolisme du soufre chez la **levure *S. cerevisiae*** et donc la surproduction de **glutathion**, une molécule **chélatant** le cadmium. Chez la plante ***Arabidopsis thaliana***, l'exposition au cadmium module l'expression de **phytochélatines** impliquées



Germination *in vitro* d'*Arabidopsis thaliana*. Le semis a été effectué sur un milieu gélosé nutritif de façon stérile. Après 48 heures passées à 4 °C et dans l'obscurité, les boîtes sont mises en culture dans une enceinte jusqu'à obtention de plantules transférables pour diverses manipulations (environ une semaine).

P. Auvian/CEA

dans la séquestration du cadmium. Une démarche similaire impliquant des approches combinées de transcriptomique et protéomique souligne des différences significatives de réponses à une exposition à l'uranyle de lignées cellulaires humaines (rein et poumon). Ainsi, pour les cellules rénales, la protéomique révèle des modifications des protéines du cytosquelette et la transcriptomique montre des altérations plus fines, en particulier l'implication d'un régulateur de la minéralisation, démarche validée par l'identification de la protéine impliquée.

L'utilisation de ces approches globales devrait conduire à l'émergence d'une toxicologie prédictive, au développement de modèles expérimentaux ou



Synthèse des peptides. Analyse et dosage d'échantillons contenant des métaux toxiques.

P. Auvian/CEA

(4) Institut de la Direction des sciences du vivant.

(5) Unité mixte de recherche 5168 - CEA - CNRS - INRA - Université Joseph Fourier.

(6) Institut de biologie environnementale et biotechnologie/ Direction des sciences du vivant.

encore à des méthodes alternatives de type *in silico* ou méthodes QSAR (pour *Quantitative Structure-Activity Relationships*).

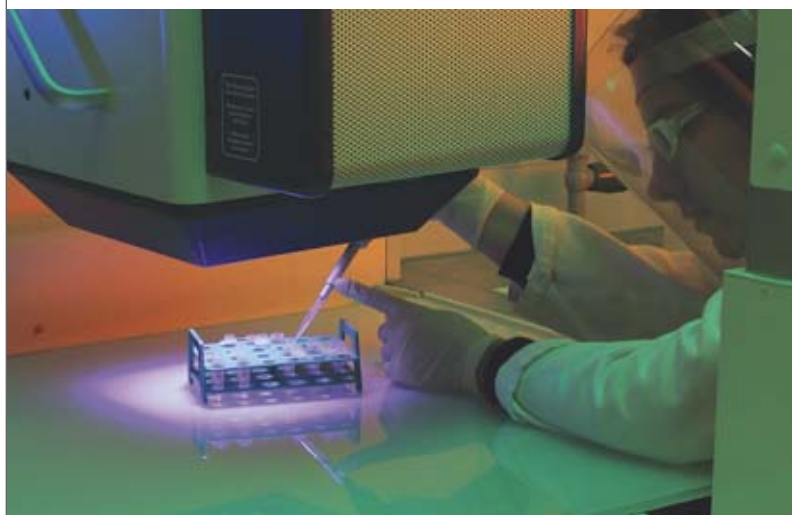
Des techniques analytiques toujours plus performantes

Adapté à la détection de **traces**, le développement de techniques analytiques performantes, ou approche *in analytico*, permet de mieux caractériser les espèces chimiques d'un milieu donné et d'accéder à leur spéciation. Ces techniques, utilisées sur des systèmes modèles, puis couplées à des approches de **modélisation**, peuvent prévoir l'incidence de molécules organiques ou minérales et du **pH** sur la **biodisponibilité** des toxiques. Une approche, intégrant l'expérimentation et la modélisation par le développement et l'évolution de logiciels de spéciation⁽⁷⁾ et de bases de données⁽⁸⁾, a contribué à une meilleure connaissance des radionucléides⁽⁹⁾. Ces techniques analytiques bénéficieront à la biologie. Ainsi, l'analyse élémentaire, associée aux techniques d'imagerie telles que la **microscopie électronique à balayage** ou **en transmission**, a permis de préciser la forme chimique des métaux présents aux niveaux cellulaire et subcellulaire, notamment l'uranyle (sous sa forme uranium VI-phosphate) dans les **lysosomes** des cellules rénales. Par ailleurs, l'exposition de **kératinocytes** au cobalt entraîne sa localisation préférentielle dans le noyau et dans le cytoplasme ainsi qu'une diminution du magnésium et du zinc intracellulaires. Les techniques de spectrométrie de masse, associées ou non, à des méthodes séparatives, offrent également des outils puissants à la caractérisation des complexes métal-ligands formés. Des analyses réalisées par **Electro Spray Ionization/ESI** et **Electrospray Mass Spectrometry/ES-MS** ont été employées pour déterminer les différentes formes du Co^{2+} en présence de petits ligands tels que certains **acides organiques** ou **aminés** et des **peptides** présents dans les milieux biologiques. Quant à la **spectroscopie de fluorescence laser résolue dans le temps (TRLFS)**, elle permet de déterminer directement des **stoechiométries** et des constantes de formation de complexes pour des éléments **fluorescents** comme l'uranium ou les **terres rares**: ceci a conduit, par exemple, à la caractérisation des différentes espèces uranyle/

phosphate en fonction du pH du milieu, à la détection de complexes uranyle/protéine (**transferrine**) ou encore uranyle-peptides (peptides issus de la **calmoduline**).

Toxicité à l'échelle moléculaire

Il existe plusieurs étapes dans la compréhension des mécanismes moléculaires de toxicité des métaux: d'abord, l'identification des protéines-cibles transportant et/ou favorisant leur accumulation dans les cellules des organes-cibles, puis la détermination des paramètres physico-chimiques et **thermodynamiques** caractérisant et quantifiant les interactions protéine/métal, et enfin les conséquences structurales ou fonctionnelles en découlant. La spéciation des métaux dans les milieux biologiques complexes (milieux de culture, fluides biologiques ou extraits cellulaires) s'avère souvent très incomplète, notamment en ce qui concerne l'identification des complexes métaux/protéines. Leur isolement constitue une approche permettant d'identifier la formation de complexes potentiels. Grâce aux techniques de la chimie séparative, le recours à des méthodes **chromatographiques**, mettant en jeu l'immobilisation d'un métal (cobalt, nickel) par un chélatant (**acide nitrilotriacétique/NTA** ou **acide iminodiacétique/IDA**) greffé sur une phase stationnaire, conduit à isoler les protéines affines pour ces métaux. Des équipes de l'Institut de chimie séparative de Marcoule (ICSM)⁽¹⁰⁾ et du Lepc sont parvenues à obtenir une avancée en immobilisant de l'uranyle sur un support présentant des **amines phosphoniques** greffées. Depuis, les chercheurs utilisent cette phase, dans des conditions physiologiques de pH et de **force ionique**, pour isoler et identifier des protéines affines pour l'uranyle à partir d'extraits cellulaires. Une autre approche, développée au Laboratoire des interactions protéine-métal (Lipm)⁽¹¹⁾, en collaboration avec le Département de physico-chimie, vise à isoler les complexes protéine/métal formés dans les cellules. Cette approche consiste à coupler une séparation par **électrophorèse** sur gel, en condition non dénaturante, avec une cartographie des gels (par TRLFS ou **autoradiographie**) pour identifier les interactions protéine/métal. La spéciation et l'identification de cibles potentielles du métal demeurent nécessaires mais non suffisantes pour décrire des phénomènes de toxicité. Grâce à la détermination des paramètres physico-chimiques et thermodynamiques, il devient désormais possible de caractériser et de quantifier les interactions protéine/métal. Ainsi, avec les technologies utilisant les phénomènes de **résonance plasmonique de surface**, les chercheurs du Lepc sont parvenus, en conditions physiologiques et à partir de très faibles quantités



Irradiation de cellules humaines pour étudier l'impact des rayons ultraviolets.

P. Auvian/CEA

(7) Exemple du logiciel CHESS (pour *Chemical Equilibrium of Species and Surfaces*).

(8) Exemple de la base de données BASSIST (pour Base appliquée à la spéciation en solution, aux interfaces et aux solubilités).

(9) Cette approche implique des équipes du CEA, de l'Institut de radioprotection et de sûreté nucléaire (IRSN), du Centre national de la recherche scientifique (CNRS) et de plusieurs universités.

(10) Unité mixte de recherche: CEA-CNRS-UM2-ENSCM (UMR 5257).

(11) Laboratoire de l'Unité mixte de recherche (UMR6191): CEA/CNRS/Université d'Aix-Marseille.

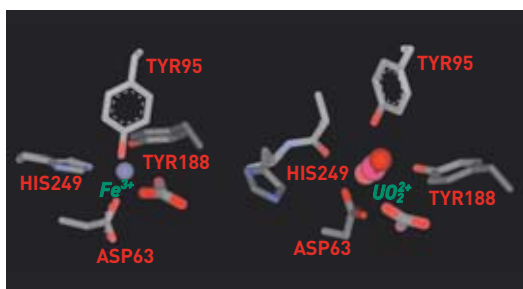


Figure 1. Organisation spatiale des ligands (histidine 249, aspartate 63, tyrosine 95, tyrosine 188 et carbonate) du site de fixation du métal de la transferrine. Cas du fer (à gauche, matérialisé par une sphère bleue) et de l'uranyle (à droite, uranium matérialisé par une sphère rose entourée de deux oxygènes-sphères rouges). Les segments gris correspondent aux liaisons carbone-carbone, les segments rouges aux oxygènes, et les segments bleus aux azotes.

de protéines, à déterminer l'affinité de celles-ci pour l'uranyle, dans une gamme allant du **nano** au **micro-molaire**, en seulement quelques heures. Ce criblage permet de couvrir de larges gammes d'affinités. Les principales difficultés rencontrées dans la mise en œuvre de techniques biophysiques classiques se trouvent contournées et cela sans connaissance *a priori* de la protéine pourtant utilisée en de très faibles quantités.

Dans l'avenir, les chercheurs devront compléter ces études pour identifier les conséquences structurales ou fonctionnelles de ces interactions. En effet, certaines protéines membranaires jouent un rôle déterminant, soit pour assimiler des substances indispensables, soit pour excréter les substances toxiques du fait de leur nature et de leur trop forte concentration dans les cellules. Aujourd'hui, plusieurs équipes de l'Ibeb, l'IRTSV et l'IBS travaillent sur l'étude structurale et fonctionnelle de ces transporteurs dans les plantes et les micro-organismes. Un résultat notable a déjà été obtenu avec l'identification de transporteurs responsables de l'entrée, ou de la séquestration de certains toxiques, dans les cellules ou les compartiments cellulaires de stockage dans le cas de la **vacuole** des cellules végétales. L'avenir consistera à mettre en évidence des motifs spécifiques dédiés au transport des métaux et à leur sélectivité. Très engagé sur cette voie, le Laboratoire des échanges membranaires et signalisation (LEMS) a démontré que la surexpression d'un transporteur de type P1B-ATPase, *AthMA4* (pour *Arabidopsis thaliana Heavy Metal Associated*)

avait pour conséquence une accumulation accrue de cadmium dans les parties foliaires. Ce transporteur prenant également en charge le plomb et le cobalt, cette découverte a donné lieu au dépôt d'un brevet international sur l'applicabilité de ce procédé dans le domaine de la phytoremédiation.

Chez l'homme, certains métaux se lient à la transferrine, protéine majeure de l'**homéostasie** du fer. Des chercheurs de l'Ibeb ont démontré que la liaison de l'uranyle aux ligands des sites de fixation du fer de cette protéine ne conduisait pas au changement de conformation nécessaire à sa reconnaissance par des récepteurs cellulaires spécifiques (figure 1). Une géométrie finale a été proposée par une approche *in silico*, utilisant un **algorithme** spécifiquement développé pour prédire des localisations de l'uranyle au sein des protéines. L'impossibilité, pour des cellules, d'internaliser le complexe transferrine/uranyle a été confirmée, validant ainsi l'ensemble des résultats *in vitro* et *in silico*.

Les connaissances générées par ces recherches constituent un apport majeur pour l'évolution des règles de protection et le développement d'outils de détection (**biosenseurs**), de **biodépollution** ou de **décoration**.

Les chimistes au chevet du génome

L'**ADN** est une cible privilégiée des toxiques et polluants. En effet, la modification de sa structure chimique, par des agents physiques ou chimiques, peut conduire à l'apparition de **mutations**, sources de tumeurs. L'étude d'impact d'un toxique suppose donc un volet de **génétoxicologie**, discipline où la chimie joue un rôle prépondérant.

Aujourd'hui, des études de réactivité, réalisées sur des systèmes modèles, ont permis de caractériser la nature chimique des dommages induits par les génotoxiques dans l'ADN : cassures de chaînes et produits de modification de la structure chimique des bases (**oxydation**, **alkylation**...). Les apports de la chimie analytique, de la synthèse organique et de la **résonance magnétique nucléaire (RMN)** ont contribué à identifier, au niveau cellulaire, un nouveau dommage. Cette lésion, due aux **rayonnements ionisants**, conjugue cassure, pontage et base modifiée. D'autres études privilégient des approches de **chimie quantique**, notamment pour élucider les mécanismes de formation des dommages.

Désormais, les chercheurs savent identifier les lésions susceptibles d'affecter cellules et tissus (figure 2). Pour mesurer ces lésions *in vivo*, la chimie analytique,

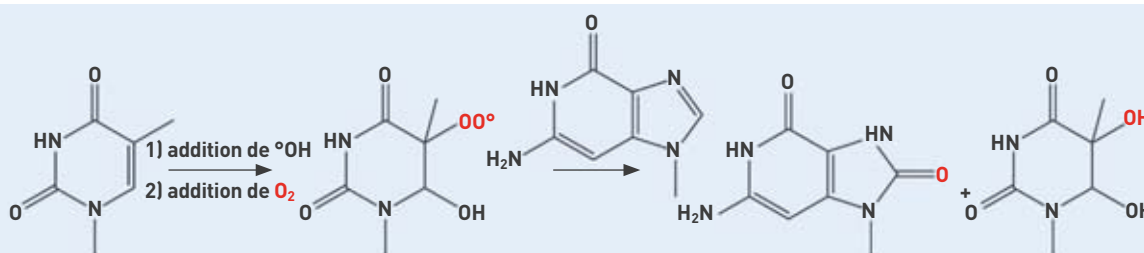


Figure 2. Mécanisme de formation de lésions oxydatives complexes dans l'ADN. L'attaque initiale d'un seul radical conduit à l'oxydation de deux bases adjacentes du fait de la réactivité d'un des radicaux intermédiaires. L'implication de l'oxygène moléculaire (repérée en rouge) a été mise en évidence par spectrométrie de masse.

en couplant la spectrométrie de masse et la **chromatographie liquide**, leur permet de détecter précisément des bases anormales au sein d'échantillons d'ADN ayant été **hydrolysés** en **monomères** afin d'en faciliter l'analyse. En matière de pollution atmosphérique, il est désormais possible de quantifier les **adduits** à l'ADN de molécules organiques, notamment le **benzo[a]pyrène**, contaminant cancérigène atmosphérique.

La capacité des cellules à réparer l'ADN endommagé et à éliminer les portions défectueuses du **génom**e est bien connue. Néanmoins, cette approche analytique a permis de révéler que deux bases oxydées, produites en position vicinale dans la **double-hélice**, s'éliminent mal. Enfin, des informations inédites sur la réparation des dommages, induits par l'exposition au **rayonnement ultraviolet** solaire, ont été obtenues dans la peau humaine.

La chimie de synthèse, de caractérisation ou analytique reste un axe de recherche majeur en génotoxicologie. La collaboration, au sein de mêmes laboratoires, de chimistes et de biologistes a permis aux équipes du CEA d'offrir des informations originales à la communauté scientifique.

> **Éric Ansoberlo**

Département radiochimie et procédés
Direction de l'énergie nucléaire
CEA Centre de Marcoule

> **Catherine Berthomieu**

Institut de biologie environnementale et biotechnologie (Ibeb)
Direction des sciences du vivant
CEA Centre de Cadarache

> **Thierry Douki et Jean-Luc Ravanat**

Institut nanosciences et cryogénie (Inac)
Direction des sciences de la matière
CEA Centre de Grenoble

> **Thu-Hoa Tran-Thi**

Institut rayonnement matière de Saclay (Iramis)
Direction des sciences de la matière
CEA Centre de Saclay

> **Claude Vidau**

Institut de biologie environnementale et biotechnologie (Ibeb)
Direction des sciences du vivant
CEA Centre de Marcoule

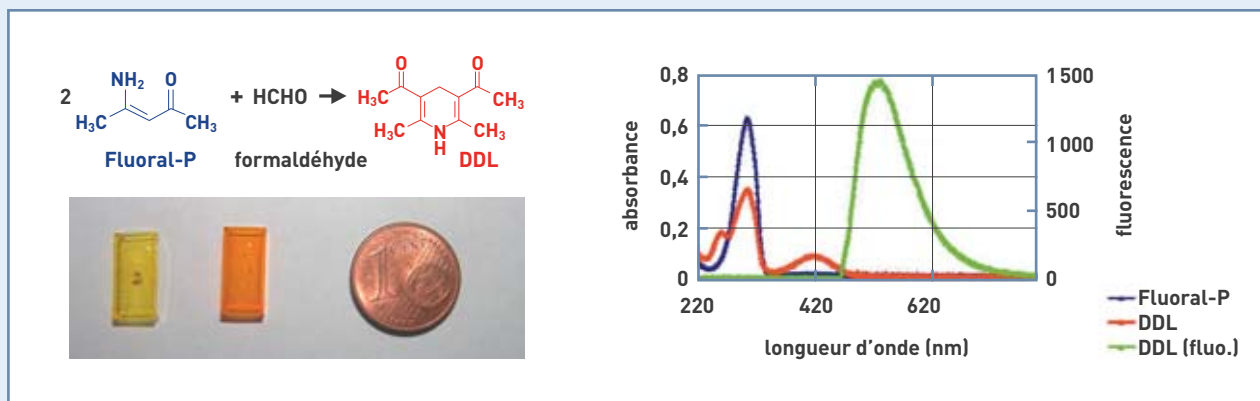
Des capteurs dopés

Les aldéhydes aliphatiques sont des polluants majeurs présents dans l'air intérieur. Le plus petit d'entre eux, le **formaldéhyde**, appartient à la classe des **cancérogènes**. Il se trouve dans des produits aussi courants que les plastiques, les résines, les colles d'agglomérés de bois, les mousses d'isolation, les germicides, insecticides et fongicides, et même dans les additifs antibactériens pour la conservation des aliments ; les industries du papier, du tannage du cuir, de la photographie, de la soie artificielle, des teintures, des explosifs, des cosmétiques... en utilisent aussi.

En lieu clos, la teneur en formaldéhyde varie entre 1 à 100 $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ et jusqu'à 500 $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$. L'Agence nationale de sécurité sanitaire

de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) préconise de ne pas dépasser les 10 $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ pour une exposition chronique. D'où la conception de capteurs innovants, à forte capacité de piégeage, composés en matériaux **nanoporeux**, dont la taille des pores, adaptable au polluant, permet de réaliser un premier filtrage des **composés organiques volatils**. Réaction particulièrement sélective, celle du formaldéhyde avec le **Fluoral-P** produit une molécule qui absorbe et « fluoresce » dans le **rayonnement visible** : la **3,5-diacétyl-1,4-dihydrolutidine (DDL)**. Les capteurs sont donc fortement **dopés** en Fluoral-P pour une réaction rapide dans les nanopores. La détection du formaldéhyde s'appuie sur la mesure

de l'absorbance ou de la **fluorescence** de la DDL. Sa vitesse de formation est proportionnelle à la concentration de formaldéhyde et la gamme de mesure établie pour sonder la qualité de l'air varie de 1 à 250 **ppb**. Depuis la création de la **start-up** ETHERA, des appareils de mesure peu coûteux sont associés à ces capteurs (voir page 70). Par ailleurs, la grande surface d'**adsorption** du matériau, équivalente à celle du charbon actif, confère au capteur une deuxième fonction de dépollution s'additionnant à celle de détection. D'autres capteurs colorimétriques pour l'air intérieur sont à l'étude, notamment pour les composés volatils présents dans l'atmosphère des piscines dont la nocivité a été récemment révélée.



À gauche : représentation schématique de la réaction du Fluoral-P avec le formaldéhyde et propriétés optiques du Fluoral-P et de la dihydrolutidine (DDL). La photo représente le capteur à deux stades différents d'exposition au formaldéhyde : de transparent, le capteur devient jaune, orange puis marron foncé quand il est saturé. À droite : spectres d'absorption du Fluoral-P (spectre bleu), de la DDL (spectre rouge) et spectre de fluorescence de la DDL lorsqu'elle se trouve éclairée à 410 nm (spectre vert).