

# Caractérisation des espèces chimiques réactives d'après leur mécanisme d'action primaire

Chacun de nous a été un jour ou l'autre confronté aux images désolantes de poissons morts flottant le ventre en l'air vers le rivage. Ces images nous font réaliser de façon brutale combien les accidents majeurs dus aux produits chimiques peuvent être dévastateurs pour les êtres vivants qui peuplent nos milieux aquatiques. Mais notre environnement est également soumis en permanence à de faibles doses de polluants dont les effets passent bien souvent inaperçus. Il est donc primordial d'apprendre la manière exacte dont les polluants chimiques se comportent au sein des êtres vivants qu'ils contaminent. Le but de notre travail est d'identifier les mécanismes d'action primaires des molécules réactives à l'aide de tests bactériologiques afin de pouvoir procéder à une classification des risques dus aux produits chimiques.

Le risque écotoxicologique lié aux espèces chimiques réactives ne peut être évalué de manière satisfaisante à l'aide des tests classiques. Cela est dû au fait que les molécules réactives sont souvent rapidement hydrolysées et que les méthodes classiques ne testent en fin de compte qu'une petite partie du grand spectre d'action de ces composés. Il est cependant particulièrement important de déterminer le mécanisme d'action des polluants chimiques étant donné que c'est lui qui conditionne la toxicité potentielle du produit. C'est pour cette raison que nous nous attachons actuellement à développer une batterie de tests bactériens permettant de couvrir l'ensemble des mécanismes d'action des espèces chimiques réactives.

## Les polluants attaquent les biomolécules

Tous les effets toxiques résultent en fin de compte d'interactions primaires entre les polluants et trois types de biomolécules: les lipides membranaires, les protéines et l'ADN [1]. Ces interactions vont des faibles affinités régies par les forces de van der Waals à la formation de liaisons chimiques en passant par des interrelations spécifiques dues p. ex. aux liaisons hydrogène ou aux forces d'attraction entre charges opposées (Fig. 1). Les relations de faible intensité induisent en général des effets non spécifiques et réversibles et n'interviennent que dans le cas de polluants hydrophobes. Les interrelations spécifiques jouent p. ex. un rôle dans les réactions d'inhibition enzy-

matiques dans lesquelles le polluant vient s'imbriquer à la manière d'une clé dans une serrure dans le site de fixation de l'enzyme qui n'est plus en mesure de réagir avec son substrat spécifique. Mais notre intérêt se porte plus particulièrement sur les espèces chimiques réactives qui établissent avec les biomolécules cibles des liaisons chimiques covalentes, en général irréversibles. Ces espèces chimiques comptent un grand nombre de substances présentant différents groupes fonctionnels réactifs. On trouve notamment dans cette famille de composés les espèces réactives de l'oxygène (voir l'article de B. Fischer, p. 15) et ce que l'on appelle les réactifs électrophiles sur lesquels se concentre plus particulièrement notre article.

## La cellule se prémunit contre les réactifs électrophiles

Les réactifs électrophiles sont des substances qui de par leur configuration électronique sont pauvres en électrons et réagissent de préférence avec les groupes nucléophiles (= riches en électrons) des peptides, des protéines et de l'ADN. Leurs cibles de prédilection sont les groupements thiols des peptides et des protéines ainsi que certains groupements oxygénés et azotés de l'ADN (Fig. 2). Dans le pire des cas, les protéines peuvent être endommagées par les réactifs électrophiles au point de ne

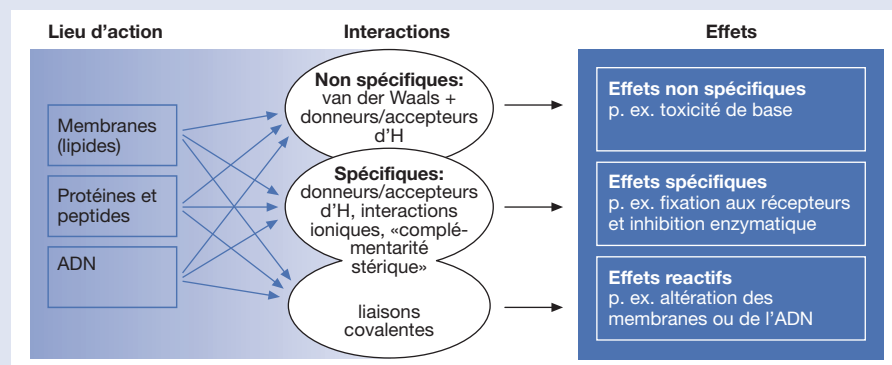


Fig. 1: Classification des effets toxiques en fonction de la nature des interactions entre polluants et biomolécules sur le lieu d'action.

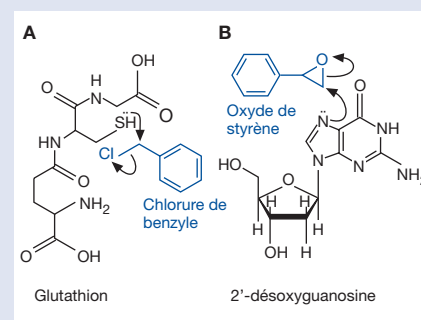




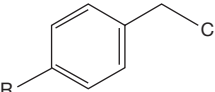
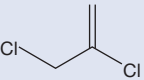
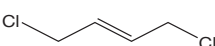
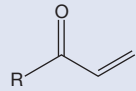

Fig. 2: Deux exemples de modes d'action primaires d'espèces chimiques réactives polluantes. Les réactions chimiques avec les protéines (A) ou l'ADN (B) induisent des effets toxiques.

plus pouvoir assurer leurs fonctions et les réactions entre électrophiles et ADN peuvent déstabiliser cette macromolécule et induire des mutations pouvant entraîner des cancers. Les réactions avec les deux cibles peuvent finalement mener à la mort.

Mais les cellules se prémunissent contre de telles attaques. Le glutathion, un tripeptide intracellulaire (Fig. 2), bloque les polluants électrophiles, qui sont ensuite rejetés de la cellule. Il existe aussi de nombreux systèmes chargés de réparer les dommages causés à l'ADN, comme p. ex. des protéines qui reconnaissent et réparent les erreurs qui se trouvent dans les séquences d'ADN. Pour des concentrations de polluant élevées et/ou des temps d'exposition prolongés, ces systèmes de défense sont cependant vite dépassés et des effets toxiques se produisent.

### Evaluation de différents mutants d'*E. coli* et de divers types d'effets

Les méthodes qui détectent une activation de ces systèmes de défense sont donc toutes désignées pour être intégrées à des tests visant une identification des mécanismes d'action primaires des réactifs électrophiles. Il faut cependant tenir compte d'un élément important: la toxicité d'une substance électrophile ne dépend pas uniquement de sa réactivité chimique mais aussi de sa concentration sur le lieu de la réaction à l'intérieur de la cellule. Cette concentration intracellulaire dépend à son tour de la quantité de molécules électrophiles qui sont absorbées par l'organisme, de la manière dont le polluant se répand dans celui-ci et de la capacité de l'organisme à le neutraliser en le transformant rapidement en un composé moins nocif. Ces processus ont donc une influence décisive sur la biodisponibilité du polluant considéré. Dans le cas des organismes unicellulaires, on peut supposer que la concentration en polluant hydrophile sur le lieu de la réaction est aussi élevée que la concentration extracellulaire. C'est la raison

Structure		Biomolécule altérée
<b>Epoxide</b>		
		
Oxyde de styrène	R = phényle	ADN
Epoxy 2,3-propylbenzène	R = benzyle	ADN
2-(4-nitrophényle)-oxirane	R = p-nitrophényle	ADN et protéines
1,2-époxybutane	R = C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	ADN
Epichlorohydrine	R = CH <sub>2</sub> Cl	ADN et protéines
2-méthyl 2-vinylloxirane		ADN et protéines
		
<b>Réactifs organochlorés</b>		
		
Chlorure de benzyle	R = H	ADN et protéines
Chlorure de 3-méthylbenzyle	R = m-CH <sub>3</sub>	ADN et protéines
Chlorure de 4-nitrobenzyle	R = p-NO <sub>2</sub>	ADN et protéines
2,3-dichloro-1-propylène		ADN et protéines
		
trans-1,4-dichloro-2-butène		ADN et protéines
		
<b>Substances avec doubles liaisons réactives</b>		
		
Acroléine	R = H	Protéines
Acrylate d'éthyle	R = O-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	Protéines
Acrylate de 2-hydroxyéthyle	R = O-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> -OH	Protéines
Acrylate d'isobutyle	R = HO-sec-C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	Protéines
Acrylonitrile		Protéines
		
Acrylamide		Protéines
		

Tab. 1: Les 17 polluants de notre étude et leur mode d'action primaire.

pour laquelle nous avons choisi de travailler avec la bactérie *Escherichia coli*. Ce micro-organisme présente également l'avantage d'être disponible sous la forme de nombreux mutants en plus de la souche d'origine. Nous avons évalué tout un éventail de souches d'*E. coli* des plus diverses. Pour nos tests, les bactéries ont été exposées à 17 réactifs électrophiles différents (Tab. 1) et nous avons mesuré les paramètres et types d'effets suivants: inhibition de la croissance, concentration intracellulaire de glutathion, interruption des brins d'ADN et activation

de différents mécanismes de réparation de l'ADN [2].

### Deux paires de souches d'*E. coli* utilisées comme biosenseurs

Nous avons obtenu des résultats particulièrement probants avec deux paires de souches d'*E. coli*. Les souches MJF276 (glutathion<sup>+</sup>) et MJF335 (glutathion<sup>-</sup>) ne se distinguent que par rapport à leur capacité de synthétiser du glutathion, sinon elles sont génétiquement semblables. De même les deux souches MV4108 (ADN<sup>-</sup>) et

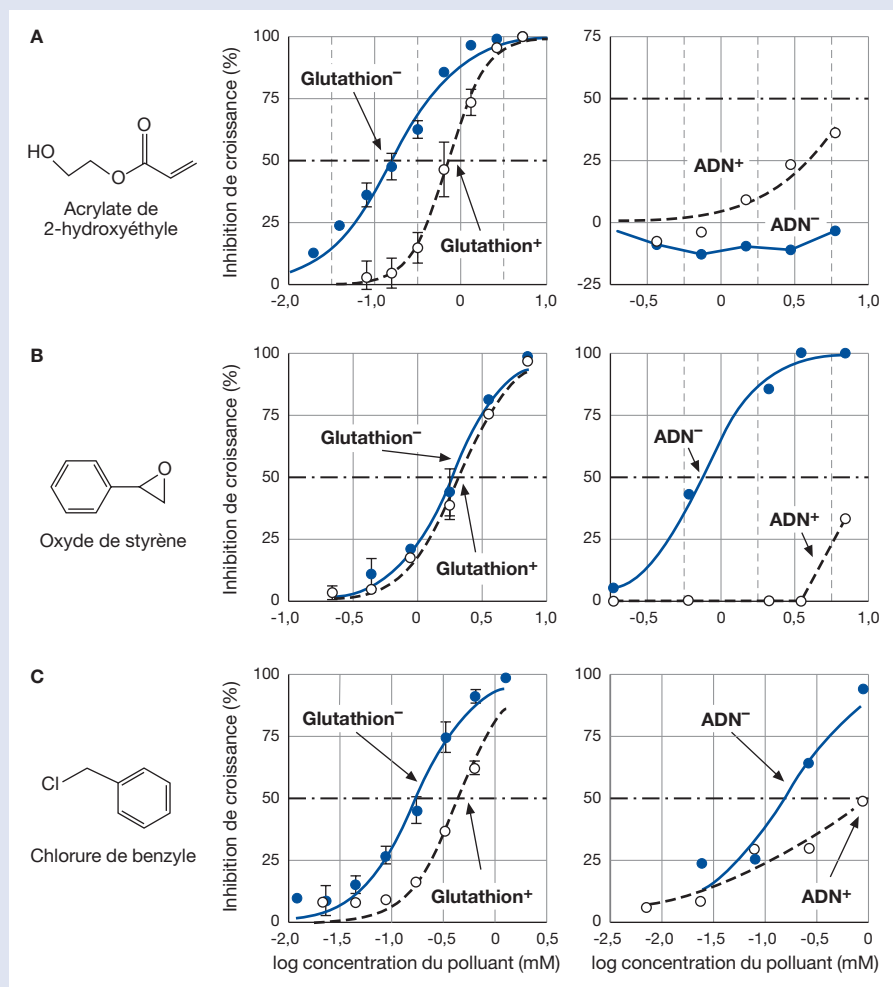


Fig. 3: Courbes de croissance des deux paires de souches d'*E. coli* glutathion<sup>+</sup>/glutathion<sup>-</sup> et ADN<sup>+</sup>/ADN<sup>-</sup> exposées à différentes concentrations de polluants.  
**A:** Exemple de l'acrylate de 2-hydroxyéthyle, un polluant altérant les protéines.  
**B:** Exemple de l'oxyde de styrène, un polluant altérant l'ADN.  
**C:** Exemple du chlorure de benzyle, un polluant non spécifique qui réagit aussi bien avec les protéines qu'avec l'ADN.

MV1161 (ADN<sup>+</sup>) sont génétiquement identiques mis à part leur capacité de réparation de l'ADN: dans la première, plusieurs gènes codant pour des enzymes de réparation ont subi une mutation annihilant leur fonction alors qu'ils sont intacts dans la dernière. Les paires de souches de bactéries ont été cultivées en suspension dans un milieu liquide contenant différentes concentrations des réactifs électrophiles à étudier. L'inhibition de la croissance a ensuite été mesurée. Ces analyses ont montré que les espèces chimiques réactives connues pour leur action dommageable au niveau des protéines induisaient de nettes différences de croissance chez les souches glutathion<sup>+</sup> et glutathion<sup>-</sup> alors qu'elles n'influaient pas sur la croissance des souches ADN<sup>+</sup> et ADN<sup>-</sup> (Fig. 3A). Les six substances à doubles liaisons activées que nous avons étudiées (Tab. 1) font partie de ce groupe de composés chimiques. A l'inverse, les réactifs connus pour leurs effets au niveau de l'ADN induisent de fortes différences

de croissance chez la paire de souches ADN<sup>+</sup>/ADN<sup>-</sup>, la croissance de la souche ADN<sup>-</sup> étant nettement inhibée contrairement à celle de la souche ADN<sup>+</sup> (Fig. 3B). Ce groupe de substances auquel appartiennent les trois époxydes étudiés (Tab. 1) ne provoque pas de différence de croissance entre les souches glutathion<sup>+</sup> et glutathion<sup>-</sup>. Nous avons d'autre part identifié un troisième groupe de composés à la réactivité non spécifique, puisqu'elles attaquent aussi bien les protéines que l'ADN (Tab. 1) et induisent des différences de croissance au sein des deux paires de souches (Fig. 3C).

### Validation et perfectionnement des tests

Les résultats de cette étude peuvent non seulement servir à une classification des modes d'action mais également à une description des effets sur les organismes aquatiques. C'est particulièrement évident quand on compare les CE<sub>50</sub> des substances appliquées à *E. coli* avec celles obtenues dans

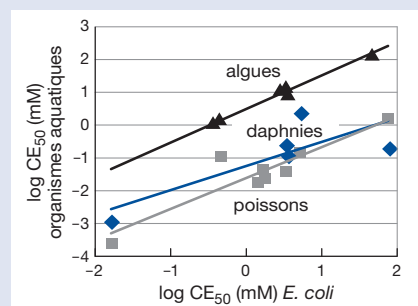


Fig. 4: Toxicité (CE<sub>50</sub>) des polluants étudiés. Comparaison des CE<sub>50</sub> pour *E. coli* avec les CE<sub>50</sub> pour les algues, les daphnies et les poissons.

des essais réalisés sur des organismes aquatiques. On constate qu'il existe une corrélation linéaire entre les différentes CE<sub>50</sub> (Fig. 4). On appelle CE<sub>50</sub> la concentration d'un polluant pour laquelle on observe 50% d'un certain effet toxique, dans notre cas l'inhibition de la croissance chez *E. coli* et algues ainsi que la mortalité chez *Daphnia* et des poissons.

L'étude décrite ici n'est qu'un début dans le domaine de l'évaluation des espèces chimiques réactives d'après leur mode d'action primaire. D'un côté, il est prévu d'intégrer les paires de souches présentées dans des batteries de tests écotoxicologiques; d'un autre côté, les concepts doivent encore être perfectionnés et étendus à d'autres modes d'action. Il n'est cependant possible de réaliser une évaluation du risque écotoxicologique différenciée qu'à partir du moment où l'on a déterminé la chaîne de causalité entre les interactions primaires au niveau moléculaire et les effets observables au niveau des populations ou des écosystèmes.



Beate Escher est chimiste et dirige l'équipe «Evaluation des composés chimiques d'après les modes d'action» au sein de la division «Microbiologie de l'environnement et écotoxicologie moléculaire» de l'EAWAG. Elle enseigne la chimie de l'environnement et l'écotoxicologie à l'EPF de Zurich. Thèmes de recherche: Absorption et distribution des composés chimiques dans les organismes, modes d'action toxiques, méthodes d'évaluation des composés chimiques.

Coauteurs: Angela Harder, Paolo Landini, Christian Niederer, Nicole Tobler

- [1] Escher B.I., Hermens J.L.M. (2002): Modes of action in ecotoxicology: their role in body burdens, species sensitivity, QSARs, and mixture effects. *Environmental Science & Technology* 36, 4201–4217.  
 [2] Harder A. (2002): Assessment of the risk potential of reactive chemicals with multiple modes of toxic action. Dissertation ETH Zurich, 78 p.