

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 neuro-dégénératives (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 sub-toxique 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 pluri-potentes 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 répliqués. 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-répliqués 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 troubles 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 society, it is important to develop new techniques for assessing the possible involvement of environmental chemical pollutants in such phenomena. The two selected articles from two US teams describe two different high-throughput, high-content assays for identifying neurotoxic molecules among the environmental chemical 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 rétinienne 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 troubles neurologiques qui étaient connus sous les noms d'autisme, de syndrome d'Asperger, de trouble envahissant du développement non spécifié et de trouble désintégréatif 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.

Revue 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