

Programme de recherche Environnement & Santé

1996-2000

- **Synthèse, mise en perspective et présentation des projets**



Ministère de l'écologie
et du développement durable
20 avenue de Ségur
75302 Paris 07 SP

agence française de sécurité sanitaire
environnementale
27-31 avenue du général Leclerc
94704 Maisons-Alfort Cedex



))) afsse •)))

agence française de sécurité
sanitaire environnementale

Programme de recherche Environnement & Santé

1996-2000

- **Synthèse, mise en perspective
et présentation des projets**

Avec la collaboration de

Robert Barouki, Philippe Beaune, Sylvaine Cordier, Philippe Hartemann

membres du Conseil scientifique du programme

Ouvrage coordonné par

Edith Legouy, Afsse

coordinatrice scientifique du programme



sommaire

Avant-propos	5
Introduction	6
EAU & SANTE	12
Contexte & connaissances scientifiques	14
Présentation des projets	17
Synthèse & perspectives	20
Résumés des projets	21
REPRODUCTION, DEVELOPPEMENT & ENVIRONNEMENT	42
Contexte & connaissances scientifiques	44
Présentation des projets	46
Synthèse & perspectives	48
Résumés des projets	49
CANCER & ENVIRONNEMENT	61
Contexte & connaissances scientifiques	62
Présentation des projets	64
Synthèse & perspectives	67
Résumés des projets	68
AUTRES THEMES DE RECHERCHE	80
Contexte & connaissances scientifiques	82
Présentation des projets	82
Résumés des projets	85
① Air, asthme & allergies	85
② Alimentation	89
③ Microbiologie	92
④ Neurotoxiques	97
⑤ Métaux : toxicité, exposition & prévention	100
⑥ Gestion & perception du risque	102
INDEX	108
<i>Les publications issues des projets</i>	108
<i>Les projets du programme 1996-2000</i>	118
<i>Composition du Conseil scientifique du programme 1996-2000</i>	126

● Avant-propos

La question du lien entre l'environnement et la santé humaine, que l'on connaît surtout du fait des nombreuses inquiétudes qu'il engendre et des polémiques qui s'ensuivent, est une redoutable question de recherche. Tout laisse penser que la santé est susceptible d'être altérée par suite de l'exposition à des substances chimiques, des rayonnements, du bruit ou d'autres agents physiques, chimiques ou biologiques d'origine naturelle ou artificielle. Des preuves existent pour certains d'entre eux, citons la catastrophe sanitaire de l'amiante dont un rapport du sénat estime que pour 2003, le coût de l'indemnisation des victimes de l'amiante s'élèverait à environ 1,1 milliard d'euros ; chiffre énorme dans son expression purement comptable, mais qui n'est rien à côté des souffrances des victimes et de leurs familles.

Pour l'essentiel des agents présents dans l'environnement, l'impact sur la santé est inconnu et le plus souvent extrêmement difficile à évaluer. Cette incertitude explique les grandes divergences entre les scientifiques dont la presse se fait régulièrement l'écho. Elle explique également pourquoi les mesures de prévention sont si difficiles à prendre. Les acteurs économiques admettent difficilement que le coût de cette prévention leur soit imputé sans preuves des risques que leur activité engendre. Enfin, il paraît difficile d'innover, de proposer des produits nouveaux, des alternatives aux moyens de production sans un minimum de connaissances sur les impacts sanitaires potentiels. Le risque économique s'ajoute au risque politique et conduit souvent au statu quo.

Convaincu de l'importance de la prévention, le ministère de l'écologie et du développement durable a le souci d'éclairer ses décisions par des connaissances scientifiques solides. Le Comité de la prévention et de la précaution conseille le ministre sur les grands enjeux de la politique sanitaire environnementale, l'Agence française de sécurité sanitaire environnementale (AFSSE) coordonne le système national d'expertise auquel contribuent des organismes scientifiques d'expertise et de recherche comme l'Institut de radioprotection et sûreté nucléaire et l'Institut national de l'environnement industriel et des risques. Enfin, le programme de recherche Environnement & Santé, créé dès 1996, incite l'ensemble de la communauté scientifique, notamment l'Institut national de la santé et de la recherche médicale, à produire les connaissances qui fondent les actions de demain.

Les thèmes de recherche de ce programme ont concerné la santé des enfants, les maladies respiratoires, les cancers, les troubles neuro-développementaux, la reproduction, la surveillance des agents polluants dans les milieux (dioxines, métaux lourds, etc.), les aliments et l'eau. A la création de l'AFSSE en 2001, le programme lui a été confié, confortant ainsi, conformément à la volonté du législateur, son rôle d'expert national par une action de recherche significative. La valorisation du programme est ainsi cohérente avec l'activité de l'AFSSE de mise à disposition des pouvoirs publics, du monde économique et du grand public de connaissances validées dans le domaine des risques sanitaires environnementaux.

Cette année, le Plan national santé environnement est venu renforcer encore le dispositif sanitaire environnemental. Il prévoit, au sein de ses nombreuses actions, un renforcement du programme de recherche environnement & santé de l'AFSSE.

En attendant les conséquences de ces décisions importantes, il convient de faire connaître le plus possible les nombreux résultats du programme et de capitaliser cette somme de résultats scientifiques obtenue grâce aux efforts de nombreux chercheurs. Grâce à leur talent et leur motivation, les politiques publiques sont mieux éclairées. Même s'il ne peut s'agir que d'une contribution modeste compte tenu de l'ampleur du problème, un premier pas important a été franchi sur le long chemin qui mène de la précaution à la prévention.

Dominique Bureau,
directeur D4E, ministère
de l'écologie et du
développement durable

Dr Michèle Froment-Védrine,
directrice générale de l'Agence
française de sécurité sanitaire
environnementale

● Introduction

Le programme de recherche Environnement & Santé (PRES) a été lancé par le Ministère en charge de l'Environnement en 1996 dans le but de stimuler la production de connaissances utiles à l'identification et la prévention des risques pour la santé de l'homme liés à l'environnement. Entre 1996 et 2000, cinq appels à projets de recherche » (APR) ont été lancés dans ce cadre, et ont conduit au financement de 109 projets sélectionnés par le conseil scientifique du programme pour leur qualité scientifique et leur originalité méthodologique. Ce document dresse un tableau synthétique des fruits de cette production scientifique et, sur cette base, propose des perspectives pour le prolongement de cet effort des pouvoirs publics en faveur de la recherche.

Après une interruption d'un an, l'animation et la coordination de ce programme ont été confiées à l'Agence Française de Sécurité Sanitaire Environnementale qui a lancé depuis deux APR (en 2002 et 2003). L'analyse des résultats des travaux acceptés pour financement dans le cadre du PRES entre 1996 et 2000 constitue une des bases de la réflexion engagée par l'Agence sur ses priorités futures en terme de soutien à la recherche. L'AFSSE s'est donc appuyé sur les contributions des responsables de projets et sur une mise en perspective des résultats, réalisée avec la collaboration du conseil scientifique du programme, pour réaliser un ouvrage de synthèse sur ces 5 années d'activité.

La commission d'Orientation du Plan National Santé Environnement, dans son rapport de février 2004, portait un regard sans complaisance sur la place de la France dans la production scientifique internationale : « Ces questions posent (...) des défis majeurs sur le plan de la connaissance. Notre pays n'a pas, dans ces domaines, su prendre sa part de l'effort collectif de la communauté scientifique internationale. Cette faible contribution réduit notre aptitude à gérer intelligemment ces risques environnementaux (...) »

Les faiblesses de la recherche française dans un grand nombre de domaines scientifiques font l'objet d'un vaste débat national, et les lacunes, tant quantitatives que qualitatives, sont particulièrement sérieuses dans les sciences contribuant à la connaissance des dangers et des risques liés aux milieux de vie, et à la gestion éclairée de ces risques. La présentation des résultats des travaux conduits avec le soutien des crédits du Budget civil de recherche et développement alloués au Ministère en charge de l'environnement est l'occasion de souligner que cette politique d'appui à une recherche finalisée a joué, au cours de cette période, un rôle dont l'importance ne saurait être sous-estimée. En témoigne, notamment, le fait que plus de 246 publications scientifiques sont directement issues de cet effort, faisant partager à la communauté scientifique internationale les fruits de cet investissement de la nation.

Honnête contribution à l'effort mondial de production du savoir. Il demeure que l'essentiel des connaissances sur lesquelles s'appuient les laboratoires français pour orienter leurs recherches, ainsi que les pouvoirs publics pour asseoir leur politique, sont produites par des scientifiques exerçant ailleurs que dans l'hexagone. Le caractère international de la recherche de haut niveau est une évidence qu'il n'est cependant pas inutile de rappeler.

Les résultats du PRES de la période 1996-2000, rassemblés dans ce document, donnent des indications très encourageantes sur l'utilité de cet effort pour apporter des connaissances contribuant à une meilleure compréhension et à une prévention plus efficace des risques liés à notre environnement, dès lors que cet effort s'inscrit dans la durée. Les champs couverts par les APR étaient relativement larges.

- Identification des agents dangereux : recherche de nature épidémiologique, toxicologique ou physiopathologique ;
- connaissance des expositions : recherche sur les voies d'exposition, distribution géographique des expositions et des impacts, définition d'indicateurs biologiques ;
- connaissances des relations entre expositions et risques pour la santé humaine : recherche biologique et toxicologique, influence de la durée des expositions, investigation sur l'importance des sensibilités individuelles à ces expositions ;
- modélisation et évaluation des risques : modèle prédictif de la toxicité, quantification des risques individuels, évaluation de la part attribuable aux différentes sources de contaminants ;

- construction sociale, perception, comportements et gestions des risques : recherche sociologique sur la perception du risque, sur l'évaluation des dispositifs de prévention, recherche économique sur l'évaluation des coûts et des bénéfices associés à la gestion des risques pour la santé en lien avec l'environnement.

Dans ce cadre thématique général, trois domaines de recherche étaient considérés comme prioritaires, sans toutefois exclure d'autres : eau et santé ; contamination des sols et/ou des aliments et santé ; habitat et santé.

Les réponses de la communauté scientifique à ces cinq APR couvrent donc un large spectre. Afin de pouvoir dégager les grandes lignes de cette activité, dans la perspective d'une réflexion sur les enjeux actuels et futurs de l'effort de recherche, les résultats sont regroupés en quatre chapitres, qui épousent les grands domaines de recherche conduits au cours de cette période :

- Eaux et santé
- Reproduction et environnement
- Cancer et environnement
- Autres thèmes de recherche

On comprendra aisément que cette segmentation n'est pas étanche. Ainsi, des agents cancérigènes présents dans l'environnement sont fréquemment portés à l'homme par l'intermédiaire de l'eau ; des substances chimiques ou des agents physiques occasionnant des troubles de la reproduction et du développement embryon-fœtal peuvent aussi être des cancérigènes.

On observera aussi que cette partition fait fi des champs disciplinaires. Il est en effet évident que l'intelligence des expositions, des dangers et des risques, et la compréhension des moyens de les réduire doivent mobiliser, parmi maints autres, les savoirs issus de l'expérimentation au laboratoire (de la culture cellulaire aux essais in vivo sur divers modèles animaux), de l'observation épidémiologique (depuis la faune sauvage au riverain de sites pollués en passant par le travailleur en contexte professionnel), des sciences de l'ingénieur (la diffusion et la transformation des polluants dans les médias, sol, air, eau, denrées alimentaires ou produits de consommation etc), ou encore des sciences humaines et sociales, indispensables à l'analyse des facteurs liés aux comportements des individus et des sociétés.

Les travaux portant sur l'eau sont les plus nombreux. C'est un domaine dans lequel la production scientifique française est relativement riche, depuis longtemps. C'est d'ailleurs aussi - sans doute faut-il voir une inter-dépendance entre les deux faits - un domaine dans lequel l'action publique est traditionnellement forte en France, aussi bien en ce qui concerne l'eau de boisson que la protection des ressources hydriques. Les travaux financés dans le cadre des APR embrassent tout particulièrement les risques microbiologiques, avec plusieurs recherches consacrées à la mise au point d'outils de surveillance de la qualité des milieux ou l'analyse de l'efficacité des dispositifs de traitement.

La recherche s'est intéressée aux moyens d'identifier la présence de virus et de parasites, agents microbiens actuellement moins surveillés que les bactéries, et d'en évaluer les risques ; elle nous rappelle que le péril microbiologique d'origine hydrique n'a pas totalement disparu, loin de là, et que la vigilance doit être continue. On notera que plusieurs projets financés au cours de la période 1996-2000 sont de nature à éclairer les pouvoirs publics sur la gestion de risques qui paraissent aujourd'hui prendre des dimensions préoccupantes ; c'est le cas par exemple du développement d'algues toxiques, en relation avec des processus d'eutrophisation de cours d'eau ou de bassins. Investir dans la recherche pour répondre aux questions de demain ...

Le second regroupement proposé concerne le vaste domaine « **Reproduction, développement et environnement** ». C'est peu dire que sont en jeu des questions scientifiques (variété des effets observables, absence de spécificité des agents en cause, difficultés de la mesure d'expositions complexes etc) et de santé publique de premier plan. Illustration encore de l'indispensable croisement des regards, de l'animal à l'homme, de l'analyse des écosystèmes à la toxicologie et l'épidémiologie, c'est le règne animal qui nous a principalement alerté sur les risques pour l'espèce humaine liés à la diffusion de polluants chimiques ayant un potentiel toxique pour la reproduction et le développement. Et il continue à nous envoyer des signaux préoccupants, comme en atteste un travail conduit dans le cadre du PRES. Certaines substances chimiques présentes dans les produits de grande consommation peuvent

s'avérer, hélas tardivement, être de redoutables toxiques de la reproduction, montrant combien stricte doit être la vigilance opérée lors de l'évaluation des dangers et des risques des nouvelles substances inventées par l'industrie chimique, avant leur mise sur le marché. Les mécanismes de perturbation des processus endocriniens font l'objet de travaux nourris dans la communauté internationale, auxquels les équipes françaises concourent.

Pour autant, nous avons toujours à connaître certains modes d'action de «grands toxiques» millénaires, tels que le plomb, sur la fertilité et le développement embryofœtal, avec pour constant souci de déterminer, s'il en est, des niveaux d'exposition (donc de qualité des milieux) sans risque.

"**Cancer et environnement**" constitue le troisième axe fort des travaux conduits sur cette période avec le soutien du PRES. L'identification des déterminants environnementaux du **cancer** est particulièrement complexe pour cette pathologie qui, plus que tout autre, est d'origine multifactorielle. Là aussi, les mécanismes de perturbation endocrinienne peuvent être en cause. Les facteurs de risque environnementaux des leucémies aiguës du jeune enfant ont été étudiés dans plusieurs projets, dont un en Polynésie.

Un autre travail a concerné le cancer (ici de la thyroïde) en Nouvelle-Calédonie, ces deux exemples montrant que l'effort de recherche intéresse l'ensemble des populations du territoire, parfois hélas pour tirer «bénéfice», sur le plan scientifique, de niveaux d'exposition plus élevés rencontrés outre mer qu'en métropole. C'est parfois aussi le statut qu'a l'épidémiologie en milieu professionnel, ainsi qu'en atteste par exemple un projet conduit sur l'exposition de travailleurs à certains hydrocarbures aromatiques polycycliques présents dans des sols contaminés. Le PRES a financé plusieurs recherches concernant les risques associés à l'exposition aux rayonnements ionisants, dont ceux résultant des émissions naturelles du gaz radon et de ses descendants.

Le dernier regroupement proposé est plus composite. Il porte sur des travaux intéressants des domaines variés, mais en nombre plus modeste. On y trouve en place remarquable plusieurs projets concernant la relation entre la qualité de l'environnement intérieur et le développement de l'épidémie d'asthme et de maladies allergiques depuis une trentaine d'années dans le monde, travaux tendant à renforcer «l'hypothèse hygiéniste».

Le potentiel neurotoxique de certains polluants organiques ou inorganiques diffusés dans nos milieux de vie constitue un très sérieux motif de préoccupation. Là encore, l'interprétation des faits tire bénéfice de la combinaison de recherches expérimentales (des rats exposés à des solvants courants) et d'observations épidémiologiques, en population générale ou professionnelle ; on soulignera sur ce dernier point la conduite d'une des plus grandes enquêtes épidémiologiques au monde sur les relations entre la maladie de Parkinson et l'exposition à des pesticides. Les pressions que l'homme exerce sur son environnement ont aussi été étudiées sous l'angle des menaces générées par la large diffusion des antibiotiques dans les milieux de vie et les phénomènes de résistance bactérienne qui en découlent.

Une mention toute particulière est enfin à faire des recherches relevant des sciences humaines et sociales. Elles sont encore en nombre faible, témoignant de l'engagement encore modeste de cette communauté scientifique, en France, sur les thématiques touchant à la santé de l'homme en relation avec l'environnement. Il y a certainement là un secteur de la recherche qu'il convient de mobiliser par un effort soutenu.

Cet effort de recherche - dont le lecteur appréciera les résultats détaillés plus loin et introduits par des «éditoriaux invités» de trois grands spécialistes des sujets traités, membres du conseil scientifique du programme - est donc poursuivi par l'AFSSE depuis que le Ministère en charge de l'environnement lui a confié la conduite et l'animation du PRES.

Ce soutien à la recherche s'articule avec les grands organismes de recherche et avec l'Université car il ne peut s'agir pour l'Agence, ne disposant que de moyens limités et ne disposant pas du levier essentiel des créations de postes et de laboratoires, de se substituer à ces établissements, qui sont, en France, les acteurs majeurs de la politique scientifique dans le domaine environnement-santé comme dans les autres champs de la connaissance. Dans le cadre des partenariats qu'elle noue progressivement avec ces établissements,

l'AFSSE est fondée à leur adresser un message fort sur les domaines en direction desquels elle les invite aussi à mobiliser leurs équipes. Car la mission de l'Agence est de «fournir au Gouvernement l'expertise et l'appui scientifique et technique nécessaires à l'élaboration et à la mise en œuvre des politiques publiques relatives à la sécurité sanitaire environnementale.»

Pour remplir cette mission, l'Agence doit nouer des relations privilégiées avec la communauté scientifique productrice de savoirs pour identifier les chercheurs capables et désireux de s'inscrire dans une fonction d'expertise, et pour alimenter un courant de veille scientifique sur ces questions. Elle doit aussi, par les moyens financiers propres qu'elle met à disposition de la communauté scientifique, chercher à polariser les questions scientifiques que se posent les chercheurs, afin de les amener à infléchir leurs projets en vue de produire des connaissances les plus utiles à l'identification et à la réduction des risques. Il s'agit bien d'une recherche finalisée en appui aux politiques publiques de maîtrise des risques.

La politique de l'AFSSE en faveur de la recherche doit enfin contribuer à attirer des chercheurs nouveaux vers les problématiques santé-environnement. De nombreux laboratoires en recherche biologique, clinique ou en sciences humaines produisent des connaissances ou développent des outils et approches qui pourraient contribuer à mieux comprendre les mécanismes d'action et les moyens de prévention des agressions environnementales.

C'est sur la base de ce socle de connaissances maîtrisées et d'incertitudes mises en lumière qu'il convient aujourd'hui de dessiner les orientations des futurs appels à la communauté scientifique pour qu'elle contribue, par ses travaux, à éclairer les politiques publiques de gestion des risques environnementaux. Ces orientations s'inscrivent dans le cadre défini par le Plan National Santé-Environnement, et en particulier par son volet visant à «mobiliser et développer le potentiel de recherche et d'expertise». Pour être efficace, l'action incitative de l'AFSSE en direction de la recherche devra à l'avenir être réservée à des priorités bien définies, en nombre limité, et être inscrite dans la durée.

Quelles sont ces priorités ? L'analyse des fruits de la recherche conduite dans le cadre du PRES jusqu'à 2002, la prise en compte des grands courants de la recherche internationale dans ce domaine, les besoins formulés à l'Agence par les pouvoirs publics depuis sa création, la nature de ses partenariats avec les grands établissements en charge de la mise en œuvre de la politique scientifique du pays, et enfin les orientations définies par le PNSE, ont conduit l'AFSSE à cerner, avec l'aide de ses instances de conseil scientifique, 5 domaines prioritaires :

Toxiques pour la reproduction dans l'environnement. Les questions scientifiques sont nombreuses, les signaux issus de l'observation du monde animal sont préoccupants, les attentes de la société sont fortes. Dans ce domaine vaste et complexe, les chercheurs sont appelés à s'intéresser aux émissions de substances potentiellement dangereuses, à leur diffusion dans les milieux, aux connaissances de leurs dangers (pouvant affecter la fertilité, l'issue de la conception ou la santé du jeune enfant, notamment via des mécanismes de perturbation endocrinienne), à l'évaluation des risques, aux représentations sociales et aux facteurs limitants de l'action publique pour la maîtrise et la réduction des risques, avérés ou suspectés.

Agents cancérigènes dans l'environnement. Parmi les nombreux cancers qui ont connu une augmentation au cours des 20 dernières années, chez l'adulte ou chez l'enfant, certains sont, au moins en partie, dus à des facteurs environnementaux d'ordre physique, chimique ou microbiologique. Là aussi, les «angles d'attaque» pour la connaissance sont multiples : caractérisation des émissions d'agents dangereux, diffusion et transformation dans les milieux, mesure du danger et compréhension des mécanismes en jeu, évaluation des risques, pratiques et représentations sociales, freins à l'action publique etc.

Risques infectieux liés aux milieux de vie. L'action de l'homme sur les milieux et l'explosion des transports transforment ses relations avec la vie microscopique : il déplace les âges d'exposition aux agents microbiens, sélectionne, par l'usage immodéré des antibiotiques et biocides, des pathogènes résistants, affecte les écosystèmes locaux ou globaux, donnant lieu à l'émergence ou la réémergence de pathologies infectieuses nouvelles ou anciennes. Les connaissances attendues portent sur les méthodes d'analyse de la qualité des milieux et les indicateurs de surveillance, sur les facteurs de virulence et de susceptibilité, sur les moyens de contrôle du péril infectieux, sur les représentations sociales de cette menace à la fois ancienne et nouvelle, et, là encore, sur les facteurs limitants de l'action publique.

Points critiques en évaluation du risque. Un «métier» central de l'AFSSE est l'évaluation du risque, cette activité est au cœur de l'interface entre dangers, risques et action publique. Les concepts, méthodes et outils sont en perpétuel développement, vers des applications toujours plus nombreuses. Pour appuyer cette fonction d'évaluation du risque, l'Agence souhaite le développement de recherches d'ordre méthodologique ou proposant des applications exemplaires sur des questions constituant des facteurs d'incertitude importants.

W

Des exemples sont les modèles prédictifs de toxicité, les questions relatives aux transpositions inter-espèces, aux relations dose-réponse aux faibles doses, à l'évaluation des dangers et des risques liés à des expositions multiples, à l'analyse des incertitudes.

Sont également encouragées les recherches sur des approches innovantes de caractérisation des expositions personnelles ou collectives, des méthodes nouvelles pour l'élaboration de valeurs toxicologiques de référence, etc.

Nuisances sonores. Ce thème pourra surprendre. Il a été retenu car il s'agit un domaine « orphelin » de la recherche. Mais le public ne l'oublie pas, il est le principal motif de plainte relatif à la mauvaise qualité de l'environnement.

Le bruit, sous toutes ses formes, «coûte» à la société non seulement par les déficiences auditives parfois précoces qu'il occasionne, mais aussi, sans doute, par le stress, la perte de chance des apprentissages, sa contribution aux accidents de la vie courante et de la circulation - par manque de sommeil -, ou suite à une consommation accrue de calmants.

Pour mettre en lumière ces phénomènes diffus, des travaux de recherche sont nécessaires sur l'appréciation de ces divers impacts des nuisances sonores, sur les pratiques sociales de production du bruit et de protection, sur et les limites de l'action publique etc.

Les risques en émergence. Si les domaines exposés précédemment constituent les axes prioritaires des prochains appels à projets de recherche, comment tout prévoir ? Il est indispensable, pour être en mesure d'alerter les pouvoirs publics, que se développe une recherche « sentinelle », sur des sujets nouveaux encore peu ou pas explorés, pouvant constituer les graves menaces de demain.

Ces priorités affichées ont pour points d'entrée des catégories d'effets sanitaires, des types de nuisances ou d'agents menaçants, ou encore des questions d'ordre méthodologique pour l'amélioration de nos outils et approches en évaluation des risques.

Elles ne sont pas assujetties à des milieux ou environnements particuliers. L'eau, les sols, l'air extérieur ou intérieur, les produits de consommation ou les déchets sont également concernés, et le sont d'autant plus que les projets chercheront à appréhender des expositions via de multiples média ou de multiples agents.

Les projets s'intéressant à des populations vulnérables ou cherchant à identifier les déterminants socio-démographiques, comportementaux ou génétiques de plus grande susceptibilité sont particulièrement sollicités, car ils sont particulièrement pertinents pour éclairer l'action publique.

La réflexion collective qu'a nourrie l'élaboration du Plan national santé environnement a été l'occasion de mettre en lumière les nombreux points de faiblesse de l'organisation de la recherche dans notre pays, ainsi que de sa valorisation sous forme d'expertise.

Elle a aussi mis en avant quelques grandes questions auxquels les experts souhaitent voir les pouvoirs publics accorder une attention toute particulière, que les risques en cause soient avérés ou que les menaces potentielles soient plus hypothétiques.

Si la production des connaissances qui motivent ces préoccupations des experts est un processus se déroulant aujourd'hui au plan mondial, en revanche la gestion des risques

identifiés ou suspectés s'inscrit bien dans un contexte social, économique, politique ou culturel particulier, local, national ou européen. A cet égard, l'expérience concrète de la construction de savoirs est toujours plus édifiante que la simple acquisition de connaissances produites ailleurs.

Une collectivité qui se mobilise pour comprendre est mieux armée pour agir que si elle s'en remet aux expériences des autres, aussi pertinentes soient-elles. Construire les moyens d'une action énergique et efficace contre les menaces que notre activité industrielle et notre organisation sociale font peser sur la santé de nos milieux de vie, sur notre santé ou celle des générations futures appelle donc une forte mobilisation en faveur de la production des connaissances.

Les travaux conduits entre 1996 et 2000 dans le cadre du programme de recherche Environnement & Santé portent témoignage de ce que nous disposons, en France, d'un potentiel de qualité qui ne demande qu'à poursuivre son engagement en faveur de la santé publique.

Pr Denis Zmirou-Navier,
directeur scientifique de l'Agence française
de sécurité sanitaire environnementale



Eau & santé

Pr. Philippe Hartemann

Université de Nancy, Membre du Conseil scientifique
du programme de recherche Environnement & Santé

Contexte et connaissances scientifiques

L'Organisation mondiale de la santé (OMS) estime à 1,5 milliard le nombre de personnes dans le monde ne disposant pas d'eau potable (100 millions dans la zone européenne), à environ 30 000 le nombre de personnes mourant chaque jour d'avoir bu une eau dangereuse ou de déshydratation et à 35 % les gastro-entérites (GE) aiguës dues à des virus transmis par l'eau. Ces quelques chiffres montrent l'importance des dangers pour la santé associés aux eaux, et la nécessité d'une évaluation des risques d'origine hydrique pour la définition de mesures préventives. Bien que la situation soit mieux maîtrisée dans les pays industrialisés, elle reste néanmoins fragile. La loi de santé publique a fixé en France des objectifs d'amélioration de la qualité des eaux en vue de diminuer les pathologies d'origine toxique (ex. plomb) ou infectieuse (ex. légionelloses) qui sont encore trop fréquentes dans notre pays.

D'importance biologique capitale, à la fois matière première et aliment, l'eau, suit un cycle qui, des mers, lui permet après évaporation de retomber en pluie et d'alimenter les ressources en **eaux superficielles et souterraines**. Les divers usages de ces ressources, dont l'alimentation, la baignade, l'agriculture et l'aquaculture occasionnent des contacts directs ou indirects avec l'homme. Les eaux souterraines sont en principe les seules capables de fournir une eau naturellement pure, mais seules les eaux de surface permettent de disposer aujourd'hui de quantités considérables pour des consommations diverses.

Ces ressources hydriques subissent des contaminations plus ou moins importantes, directement par les eaux résiduaires déversées dans le milieu naturel ou indirectement par le lessivage ou la percolation à la suite des épandages agricoles, à partir de sols industriels pollués, ou par la solubilisation de polluants présents dans des déchets stockés dans de mauvaises conditions. Les eaux de surface peuvent également véhiculer des microorganismes et des polluants chimiques, d'où la nécessité d'un traitement adapté avant leur utilisation.

Les eaux marines et surtout littorales, qui servent principalement à l'aquaculture mais parfois, après dessalement, à la préparation d'eau pour l'agriculture et la consommation peuvent être également polluées par des agents biologiques ou chimiques (navigation, produits pétroliers, déversements industriels, déchets radioactifs...). Même pour la baignade, certaines de ces eaux deviennent impropres, en particulier en raison de la pollution microbiologique déversée par les eaux usées qui restent la source principale de pollution du milieu hydrique.

Les pollutions majeures : natures et origines

Schématiquement, il est utile de distinguer deux grandes catégories de pollution des milieux hydriques.

● Les pollutions microbiologiques

On connaît depuis longtemps l'existence de maladies hydriques dont l'agent pathogène, microbien, souvent d'origine entérique (c'est-à-dire lié aux intestins) est véhiculé par les eaux, notamment usées et superficielles. Cet agent peut être d'origine bactérienne (salmonelles, shigelles, *Escherichia coli* et bacilles coliformes, vibrions cholériques, *Legionella*, etc...) ou virale. Les virus les plus fréquemment observés dans les eaux polluées sont les entérovirus (tels que les poliovirus), mais aussi les Coxsackie virus et les Echovirus, responsables de gastro-entérites et/ou de syndromes neuro-méningés, le virus de l'hépatite A, des Corona et Rotavirus, agents de gastro-entérites, en particulier infantiles. En général, ces virus sont particulièrement résistants dans l'environnement et aux traitements de désinfection. Cette propriété est partagée par de nombreux parasites, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* et *Cryptosporidium parvum*, dont les kystes, résistants aux désinfectants, peuvent survivre très longtemps dans l'eau.

● Les pollutions physico-chimiques

Les divers facteurs de pollution physico-chimique posent un problème difficile et urgent, menaçant la qualité des eaux superficielles mais aussi des nappes souterraines et des eaux marines. La pollution par les sels minéraux est fréquente : il s'agit de sodium, chlorures mais surtout nitrates, provenant des effluents domestiques, des engrais agricoles et de certains établissements industriels (abattoirs, tanneries...) et retrouvés dans les nappes souterraines. Les dérivés du phosphore sont issus des lessives et participent, avec ceux de l'azote, aux phénomènes d'eutrophisation (appauvrissement de l'eau en oxygène, phénomène qui peut conduire à l'apparition de marées vertes, etc.).

Les métaux (plomb, mercure, cadmium...), représentent une forme particulière de pollution chimique. Déversés par les industries ou par lessivage des sols urbains sur lesquels se sont déposés les diverses pollutions liées au trafic, au chauffage..., ils peuvent s'accumuler dans les rivières, ainsi qu'en certains points du littoral et ainsi atteindre la flore et la faune aquatique (coquillages, poissons). Cette forme de pollution a été et est encore à l'origine de foyers d'intoxications : maladie de Minamata au Japon et en Guyane (dérivés mercuriels),

maladie Itaï-Itaï (cadmium). Même absorbés à faibles doses par le consommateur, ils peuvent s'accumuler et être responsables de pathologies à long terme affectant, selon les cas, le système nerveux, le rein et le squelette.

La pollution organique par les détergents non biodégradables, les pesticides, les hydrocarbures, les solvants, est une autre forme de pollution chimique. Inquiétante par son aspect ubiquitaire, persistant, insidieux et polyvalent et l'on se pose de plus en plus la question d'éventuels effets perturbateurs endocriniens ; certaines de ces substances pourraient en effet interférer avec le système hormonal et influencer négativement les processus de synthèse, de sécrétion, de transport, l'action ou l'élimination des hormones, comme cela a été démontré sur diverses espèces animales (poissons et oiseaux prédateurs de poissons, mais aussi chez des mammifères), y compris l'homme.

La pollution thermique résulte du déversement dans le milieu naturel de quantités considérables d'eau utilisées pour le refroidissement dans certaines industries (production d'énergie, principalement). Elle menace d'élever la température de l'eau des rivières à un degré incompatible avec le maintien de certaines espèces mais, surtout, de favoriser l'émergence de nouveaux dangers (ex : amibes libres thermophiles, responsables de cas d'infections mortelles).

La pollution radio-active est particulièrement redoutable, surtout lorsqu'il s'agit de produits à très longue durée de vie ; elle n'est pas d'actualité dans nos pays où elle résulte d'accidents ponctuels. Les émetteurs de rayonnement alpha (²²⁶Ra, ²³⁴U, ²³⁸U, ...) sont généralement d'origine naturelle et susceptibles d'être présents dans les eaux souterraines de zones géologiques déterminées (par exemple granitiques pour le radon). Les émetteurs beta sont en général associés à des activités humaines (⁹⁰Sr, ¹³⁴Cs, ¹³¹I, ...), la radio-contamination provenant de déversements hydriques volontaires ou accidentels et de retombées atmosphériques. La plupart des radionucléides s'adsorbent facilement sur des particules (sédiments des eaux, boues d'épuration). En outre, des organismes vivants (poissons, mollusques, crustacés, ...) sont capables d'accumuler certains radioéléments, créant une contamination de la chaîne alimentaire.

L'eau est donc un patrimoine à préserver, présente en quantité limitée, et dont la qualité est fondamentale pour ses divers usages potentiels. Elle doit être gérée en fonction de ces usages, pour des besoins parfois contradictoires ; ceci nécessite la définition de schémas de gestion et d'objectifs de qualité.

Les principales pathologies d'origine hydrique : polluants et voies d'exposition associées

Le risque d'origine hydrique est généralement lié à une dégradation de la qualité des milieux (sol et eaux), le plus souvent par suite d'une mauvaise gestion humaine des eaux résiduaires (assainissement, activités industrielles). Des problèmes sanitaires peuvent aussi être induits par des dispositifs techniques élaborés par l'homme qui, par suite d'une mauvaise conception ou maintenance, conduisent à des modifications (micro) écologiques de l'environnement humain. Le risque microbien, de loin le plus important, est réel et se manifeste à court terme ; le risque chimique, selon les cas, est réel ou suspecté, et se manifeste parfois à court terme, mais le plus souvent de manière différée.

● Le risque d'origine microbiologique

Le risque dominant est encore d'ordre "fécal", en relation plus ou moins directe avec le degré de maîtrise des eaux usées d'origine domestique ; en milieu rural, les contaminations des ressources par les déjections animales sont également fréquentes. Le risque microbiologique se manifeste soit par des phénomènes aigus ponctuels d'origine accidentelle, soit par une situation chronique résultant d'un laxisme vis-à-vis de l'assainissement. L'impact sanitaire du risque microbiologique varie selon le niveau de développement de la société concernée et selon la sensibilité des populations atteintes. Il dépend aussi des usages, professionnels ou non, des eaux.

Les risques hydriques sont, soit directs, dus à l'eau elle-même (eau usée, ressource en eau, eau de loisirs, eau destinée à la consommation humaine), soit indirects, en relation avec des aliments souillés par de l'eau contaminée (végétaux consommés crus, glaces...) et, surtout, par les coquillages, organismes bio-concentrateurs de contaminants biologiques mais également chimiques (Hartemann, 1989)

Le principal mode de contamination est constitué par l'ingestion (eaux et aliments contaminés). Le contact cutanéomuqueux à risque microbiologique concerne surtout les eaux de loisirs, les eaux et boues thermales, les eaux hospitalières (*Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Mycobacterium sp.*), les personnes en contact avec les eaux usées, ou encore des eaux superficielles contaminées (*Leptospira*). Le contact avec la muqueuse oculaire peut être en cause pour des amibes libres (par exemple par les lentilles cornéennes contaminées par lavage). L'inhalation d'aérosol biologiquement contaminé peut concerner les milieux hospitalier, thermal ou hôtelier (*Legionella*, *Flavobacterium* et *Actinomyces sp.*), et les milieux professionnels en contact avec les eaux usées. Citons, enfin, la voie très particulière constituée par l'accès parentéral (dialyses) qui peut être à l'origine de véritables intoxications (cyanobactéries), ou d'infections (*Pseudomonas* et *Aeromonas sp.* notamment). (Hasley, 1993).

La gravité des atteintes est très variable ; cela va des gastro-entérites plus ou moins graves et des parasitoses (risque d'origine fécal en général), aux atteintes cutanées ou pulmonaires parfois très graves (*Legionella*). Il est à noter que le risque microbien et parasitaire est fortement lié à la sensibilité immunologique des individus, donc à leur statut vaccinal (dans certains cas) ou physio-pathologique (sujets immunodéprimés, avec l'exemple des relations entre le SIDA et les parasites protozoaires microsporidies ou cryptosporidies). Ajoutons que le risque (micro)biologique s'élargit progressivement au fil des connaissances à certaines bactéries "non fécales", à des virus, de plus en plus souvent mis en cause, à des protozoaires mais, aussi, aux (micro)algues et à leurs toxines, qui posent des questions de santé publique à la frontière des aspects microbiologiques et toxicologiques (Vezie, 1997).

● Le risque d'origine chimique

D'une façon générale, le risque chimique peut être lié, soit à une contamination de l'eau brute (pesticides, nitrates...), soit à un traitement de l'eau (dérivés de l'aluminium coagulant, sous-produits de désinfection), soit au transport de l'eau (présence dans les tuyaux de contaminants tels que plomb, amiante, hydrocarbures aromatiques polycycliques).

Ce risque a été principalement étudié pour l'eau destinée à la consommation humaine. Dans de rares cas, il tient à un déficit en élément nutritif (iode, fluor). La plupart du temps, le risque, réel ou suspecté, à court ou long terme, est le fait d'un accroissement de la teneur dans l'eau d'un composant, phénomène qui peut être momentané ou non, accidentel ou non. Il existe par exemple des contaminations naturelles par le fluor qui peuvent aller jusqu'à entraîner des symptomatologies dues à une fluorose osseuse, comme cela a été observé dans la région de Maria en Gaspésie (Québec, Canada) et d'Etain dans la Meuse (France).

A long terme, le rôle néfaste de macro-constituants des eaux (sodium, dureté...) n'a pas été confirmé ; en revanche, certains micro-constituants sont réellement impliqués dans un risque hydrique, tels des métaux lourds (plomb, cadmium etc) ; des interrogations subsistent sur le risque cancérigène qui pourrait être induit par certaines molécules organiques (pesticides, haloformes) et, d'une manière plus générale, par les sous-produits minéraux ou organiques de la désinfection des eaux (chloration surtout).

Les développements méthodologiques en matière d'évaluation du risque

Les travaux relatifs aux méthodes d'évaluation du risque chimique d'origine hydrique sont nombreux dans la littérature internationale et ne présentent pas de singularité particulière.

En revanche, les conditions de l'évaluation du risque de nature microbiologique sont elles particulières, car elles doivent pouvoir tout spécialement apprécier le potentiel de survie ou de développement des agents microbiens dans les milieux hydriques, ainsi qu'aux possibles compétitions entre germes (Haas, 1983, 1996), (Rose, 1991).

Références bibliographiques

Haas CN. Estimation of risk due to low doses of microorganisms: a comparison of alternative methodologies. *Am J Epidemiol* 1983;118(4):573-82.

Hass C, Crockett C, Rose JB, Gerba C, Fazil A. Assessing the risk posed by oocysts in drinking water. *Journal of the American Water Works Association* 1996;3:131-137.

Hartemann P. Microorganismes et environnement, une perpétuelle évolution. *Santé publique* 1989;5: 26-37.

Hasley C, Leclerc H. Microbiologie des eaux d'alimentation. Paris: Tech doc, Lavoisier; 495p.

O.M.S., Directives de qualité pour l'eau de boisson, Vol 1, Recommandation, 2e ed., Genève, 1994, 202 p.

Vezie C, Bertru G, Brien T, Lefevre J. Blooms de cyanobactéries hépatotoxiques dans l'Ouest de la France. *Techniques Sciences Méthodes* 1997; 92(10):39-45.

La contribution du programme de recherche Environnement & Santé (PRES) à ce corps de connaissances est tout à fait importante. Il est à noter que les projets de recherche conduits au sein de ce programme couvrent la quasi-totalité du champ, de la caractérisation des pollutions du milieu hydrique aux effets sur la santé, de la chimie à la microbiologie, des coquillages à l'homme.

La pollution microbiologique

Les projets retenus ont couvert l'ensemble de la problématique, de l'étude des eaux usées et des boues de stations d'épuration au "consommateur" via la baignade, la consommation de coquillages et l'eau de boisson. La plupart des sujets d'actualité et des pathogènes émergents ont été abordés et la somme des connaissances acquises par ces équipes permet à la France de tenir un rang tout à fait satisfaisant dans le contexte international.

● Caractérisation des contaminations microbiologiques

L'homme et l'animal sont les principales sources de contamination. Un projet (Godon JJ et al., 1999) avait pour objectif d'étudier la survie de bactéries pathogènes dans les filières de traitement des eaux usées et lors de l'épandage de boues, par des techniques de culture classique et de détection moléculaire. S'il n'a pas été possible de tirer toutes les conclusions attendues de ce travail (du fait de problèmes d'interférences analytiques), la survie des clostridies dans les sols et leur incorporation dans les végétaux a pu être bien tracée, tandis que *Listeria* apparaît beaucoup moins résistant et disparaît assez rapidement.

Certains *Escherichia coli* sont actuellement à l'origine de véritables épidémies alimentaires (syndromes hémolytiques et urémiques) ; leur excrétion par l'homme, mais surtout par les bovins, pourrait expliquer la contamination des aliments impliqués. Un projet (Brugère H et al., 2000) avait pour objectif d'établir la prévalence et la persistance des souches shigatoxinogènes (c'est-à-dire productrices de toxines analogues à celles des *Shigella*.) d'*Escherichia coli* dans les effluents d'abattoir, en particulier des souches dites entérohémorragiques (EHEC). 5000 souches d'*Escherichia coli* ont été isolées et sont encore en cours d'étude moléculaire pour déterminer leur potentiel pathogène.

Parmi les bactéries pathogènes opportunistes, *Aeromonas* apparaît comme un germe "émergent" et un projet était consacré à son étude dans les eaux superficielles (Baleux B et al 1997). Sa présence est d'autant plus élevée que les eaux sont fortement contaminées par des apports anthropiques (concentration environ 100 fois supérieures à celles des classiques indicateurs "coliformes thermotolérants", avec augmentation liée aux périodes de pluviosité. Il n'y a aucune corrélation entre leur présence et celle des indicateurs fécaux, en particulier dans les zones de loisirs aquatiques. Les souches isolées des eaux superficielles et celles rencontrées en clinique ont les mêmes propriétés, en particulier pour ce qui concerne leur résistance dans l'environnement.

L'entérobactérie *Salmonella*, présente dans les eaux usées, a la capacité de se maintenir dans différents milieux aquatiques dans un état de dormance qui rend sa détection particulièrement difficile alors que les eaux contaminées constituent alors un réservoir de bactéries pathogènes. Le projet de Montfort et al. 2000 a permis d'étudier l'impact des conditions environnementales sur la survie et le maintien du pouvoir pathogène de *Salmonella*.

Les virus représentent des dangers pour la population dont la présence dans l'environnement hydrique est encore relativement mal appréciée faute de moyens analytiques simples. Divers projets ont été consacrés à leur étude. L'un d'entre eux (Andreoletti L et al 1998) décrit l'utilisation de techniques moléculaires pour détecter des Norovirus, des Astrovirus, des Rotavirus et le virus de l'hépatite A dans des eaux de surface, en comparaison avec une méthode de détection des coliphages somatiques (virus infectant les bactéries) et des entérovirus infectieux sur culture cellulaire proposée dans certaines réglementations. Il n'a été trouvé aucune corrélation entre ces paramètres "indicateurs" et la présence des virus cités précédemment, dont la prévalence était très faible (1 à 3 %) tandis que celle des coliphages était de 100 % pour les échantillons testés.

Un autre projet (Billaudel S et al., 1997) s'est intéressé à la détection de virus (virus entériques et virus de l'hépatite A) par techniques moléculaires dans les boues, selon leur traitement. Il a pu être ainsi démontré que trois filières classiques sont très efficaces pour éliminer ces virus, alors que la digestion anaérobie mésophile n'entraîne qu'une réduction d'un facteur dix.

Un troisième projet était consacré à la recherche de virus par techniques moléculaires dans les aires de baignade de la Gironde et dans trois stations d'épuration (Lafon ME et al. 1999). 8 % des prélèvements contenaient des génomes viraux, entérovirus pour la plupart avec également un norovirus et un virus de l'hépatite A. Deux tiers des échantillons positifs provenaient d'eau de mer, les autres de lacs, sans corrélation avec la contamination bactérienne. La charge virale des effluents de stations d'épuration était très élevée en entérovirus et norovirus, avec accumulation dans les boues.

Les parasites, en particulier *Cryptosporidium parvum*, ont fait l'objet de plusieurs études. *Cryptosporidium parvum* est maintenant fort célèbre pour avoir provoqué la plus grande épidémie d'origine hydrique connue, à Millwaukee (Etats-Unis) en 1993. Deux projets lui ont été consacrés (Ballet JJ et al 1998, Bonnin A & Roubin MR et al 1996). Ils ont permis de mieux connaître les mécanismes immunopathologiques de la cryptosporidiose, d'évaluer la viabilité et la pathogénicité des oocystes par inoculation à l'animal, et d'étudier des méthodes d'inactivation physique ou chimique toujours par ingestion ultérieure chez le rat. Une méthode a été développée pour la recherche de *Cryptosporidium* dans les eaux, avec détection de 75 % d'oocystes infectieux, méthode qui doit maintenant être validée sur un grand nombre d'échantillons.

Deux projets se sont intéressés à *Giardia Lamblia* (Bonnin A & Roubin MR et al., 1996, Brasseur P et al., 1997). Dans ce cas, la méthode développée pour la recherche de *Giardia* n'a pas encore permis une application dans le domaine hydrique. En revanche, l'étude de la viabilité et du pouvoir pathogène d'isolats de *Giardia* provenant de selles de malades et d'échantillons d'eaux a produit des résultats exploitables. Des kystes ont pu être retrouvés dans des eaux usées. Le pouvoir pathogène de ces souches a été testé par infestation de mériens (petit rongeur) et il n'a été trouvé aucune corrélation entre le nombre de kystes ingérés et le pouvoir pathogène pour l'animal, cette propriété étant liée à la souche. Certaines souches sont apparues résistantes aux imidazolés utilisés couramment dans le traitement des pathologies associées.

Un projet a été consacré au risque lié à *Toxoplasma gondii* (Pinon JM et al., 2000). Après la mise au point de techniques moléculaires de détection, il a été montré une circulation du parasite chez les chevreuils et les sangliers, tandis que dans les eaux tous les échantillons testés étaient négatifs. La méthodologie, dont la mise au point n'était pas achevée au moment de ce bilan, devra incorporer un ou plusieurs anticorps monoclonaux contre la paroi de l'oocyste pour rendre plus sensible les techniques de détection.

La protection des captages par rapport à la contamination microbiologique est donc fondamentale. Un projet (Buès M et al., 1998) avait pour objectif de mieux connaître les paramètres gouvernant la rétention d'un agent pathogène résistant (*Cryptosporidium*) dans différents types de sols permettant d'aboutir à un modèle numérique. Cependant différents paramètres biologiques semblent avoir une influence et il est donc encore empirique de prédire la percolation à travers les sols.

Les cyanobactéries représentent un problème assez récent en raison de leur prolifération liée aux apports en phosphore et en azote dus aux activités de l'homme et aux toxines qu'elles contiennent. Un projet (Humbert JF et al., 1994) s'est intéressé au suivi de leur dynamique de prolifération à l'aide d'une sonde spectrofluorimétrique comme moyen de détection. Après sa mise au point, la sonde a été utilisée sur le terrain et a permis d'établir une corrélation avec les paramètres de numération employés habituellement, sauf dans le cas particulier de *Mycrocystes*. Il y a là probablement une avancée technique très intéressante. En revanche l'utilisation d'un bioessai sur *Artemia salina* (petit invertébré) afin de détecter la toxicité n'a pas montré une spécificité satisfaisante pour remplacer les tests analytiques classiques.

Un autre projet (Itean I et al., 1999) a permis le développement d'outils moléculaires pour l'identification de cyanobactéries par amplification par PCR dont les résultats sont satisfaisants pour *Microcystis* et *Planktothrix*. On dispose ainsi d'outils qui devraient nous permettre de progresser dans la connaissance de la contamination du milieu hydrique par ces microorganismes.

● Le contrôle des voies d'exposition

Une des principales voies d'exposition est la boisson. L'eau de distribution publique subit en général un traitement de désinfection dont le résultat est apprécié par la numération des bactéries "coliformes" et des bactéries hétérotrophes aérobies et anaérobies, méthode dont les limites sont maintenant bien connues.

Un projet (Block JC et al., 1999) a cherché à développer une méthode rapide de numération par marquage cellulaire à l'aide d'un fluorochrome, les bactéries ayant une réponse altérée après chloration.

Il reste encore à bien comprendre toute la signification du signal de fluorescence mais cette approche très prometteuse fait actuellement l'objet d'un financement européen dans le cadre d'une association de plusieurs équipes de divers pays.

Les aliments contaminés par de l'eau sont une autre source de contamination. Un projet s'est intéressé à *Fasciola hepatica* (responsable de la distomatose hépatique) et aux cressonnières naturelles du Limousin (Dreyfus G et al., 1998). L'influence des techniques de culture sur la contamination a pu être mise en évidence. Le risque d'infestation humaine paraît faible mais non nul et il faut donc continuer à améliorer les pratiques agricoles et l'information du public. De même, *Clostridium botulinum*, à l'origine du botulisme, méritait d'être étudié dans les nouveaux aliments pasteurisés réfrigérés élaborés à base de poisson, viande ou de légumes, qui connaissent un vif succès (Brousseau et al., 1998).

Une technique moléculaire de détection a été appliquée à 214 échantillons de poissons, coquillages et prélèvements environnementaux, avec pour résultat une détection positive dans 14 % des cas. Les conditions de conservation permettent la survie de certaines souches et les connaissances méritent d'être approfondies dans ce domaine pour permettre une modélisation de type microbiologie prévisionnelle.

Un travail a permis également de progresser dans un domaine très peu exploré celui des relations dose-réponse (Zmirou D et al., 1996). Grâce à une étude épidémiologique prospective (EMIRA) menée en Isère et en Savoie qui a combiné un suivi longitudinal prospectif et une surveillance microbiologique de la qualité de l'eau de boisson, ont pu être décrites la fréquence des troubles digestifs aigus dans la population et la présence d'agents infectieux (parasites et virus) dans de l'eau respectant la norme de potabilité microbiologique. Il a pu en être tiré des fonctions dose-réponse pour un astrovirus et pour le parasite *Giardia lamblia*.

La contamination de la population peut aussi se faire par voie orale lors de la fréquentation des piscines. Un projet avait pour but d'étudier la contamination des eaux de baignade par *Cryptosporidium*, *Giardia*, et *Microsporidium* suite à la suspicion de cas humains de microsporidiose par ce biais (Derouin F et al., 1998). L'étude de 6 piscines à Paris pendant un an n'a retrouvé qu'un très faible niveau de contamination dans les deux échantillons positifs, semblant indiquer que les procédures de traitement et de désinfection sont efficaces.

Une autre voie d'exposition est respiratoire, la contamination se produisant le plus souvent via les aérosols. Deux projets lui ont été consacrés. Le premier s'est intéressé à l'écologie et à la maîtrise de *Legionella* et autres pathogènes opportunistes dans les eaux thermales (Levi Y et Etienne J et al., 1998). L'écologie de *Legionella* est extrêmement intéressante puisqu'elle fait entrer en jeu le biofilm avec ses composants biologiques et physico-chimiques, les populations amibiennes libres et les souches de légionelles elles-mêmes qui ne semblent pas avoir des propriétés monomorphes. La maîtrise de la colonisation des réseaux n'est pas simple et la désinfection n'a que des résultats temporaires.

Le deuxième a recherché, dans les eaux hospitalières, de nouvelles espèces bactériennes éventuellement pathogènes par co-culture d'amibes (Raoult D et al., 2000). Des séroconversions chez des malades en réanimation en relation avec des bactéries hydriques ont été mises en évidence avec caractérisation de nouvelles espèces appartenant aux genres *Bosea* et *Afiplia*. A l'occasion de ces travaux un nouveau virus géant à ADN a été identifié.

La pollution chimique

Il existe d'autres sources de financement pour les équipes s'intéressant aux retentissements des pollutions chimiques sur l'environnement et leurs conséquences possibles sur la santé, par exemple le programme PNETOX (programme national d'écotoxicologie du ministère en charge de l'environnement). Aussi il n'est pas étonnant de ne trouver ici que cinq projets financés concernant surtout des retentissements sur l'homme.

Le premier (Commenges D et al., 1997), encore en cours, avait pour objectif d'explorer plus avant l'éventuelle relation entre teneur en aluminium de l'eau et fréquence de la maladie l'Alzheimer que laissait envisager une première exploitation des résultats d'une étude épidémiologique (cohorte PAQUID), alors même que, sur le plan physiologique, cette source d'exposition paraît très minime. Cette nouvelle étude (ALMA+) a pour objectif d'approfondir la relation entre minéraux de l'eau de boisson et maladie d'Alzheimer chez des sujets de plus de 75 ans, en incluant 400 nouvelles personnes exposées à des taux «élevés» d'aluminium (cette notion étant toute relative compte tenu de l'importance des autres apports alimentaires). Des données biologiques et génétiques doivent être également recueillies et l'on attend avec intérêt les résultats de ce travail.

Une autre hypothèse d'origine des démences cérébrales est la contamination des eaux par les produits phytosanitaires, très mal connue, en raison du coût des analyses par méthode traditionnelle (chromatographie, spectromètre de masse). Un projet (Fournier D et al., 1998) s'est fixé comme objectif de les détecter à l'aide de biocapteurs utilisant des cholinestérases qui sont des cibles classiques de certains pesticides. Les résultats de cette recherche ont démontré la faisabilité de cette approche pour les pesticides organophosphorés et les carbamates dont la toxicité neurologique est bien connue. De façon plus surprenante, cette méthode permet aussi de détecter l'anatoxine, toxine naturelle des cyanobactéries. Des travaux supplémentaires sont nécessaires pour utiliser cet outil et bien connaître sa spécificité.

Les deux autres projets ont été consacrés au problème émergent des molécules à effet perturbateur endocrinien (PE). L'un (Ciapa B et al., 1997) s'est intéressé à démontrer l'impact de trois pesticides organochlorés sur la maturation des oocystes de trois espèces animales différentes : deux invertébrés marins (oursins et étoile de mer) et un mammifère (souris). Il a été observé des effets à fortes concentrations en lindane, methoxychlore et mieldrine. L'extrapolation à des expositions à faible dose ne peut être envisagée qu'avec réserve dans l'état actuel des informations.

Le deuxième (Nicolas JC) est encore en cours. Il approche la détection de ce type d'effet par la mise au point de différents outils expérimentaux : l'utilisation de lignées cellulaires indicatrices (rendues bioluminescentes en cas d'effet

PE) pour la détection de ces molécules perturbatrices endocriniennes ; le développement d'animaux transgéniques indicateurs d'impact in vivo ; la mise au point d'une méthode de capture biospécifique de xénoestrogène afin d'améliorer leur identification et leur analyse par spectrométrie de masse à partir d'un mélange complexe (par exemple boues d'épuration).

Le dernier projet s'est intéressé à l'étude des effets précoces sur la santé des sous produits de désinfection de l'eau en piscine (Nadif R et al., 1997). Cette étude de nageurs de compétition, utilisateurs intensifs et fortement exposés, a permis de mettre en évidence du chloroforme dans le sang de certains d'entre eux et de trouver une prévalence élevée de signes d'irritation de la sphère ORL. Les perturbations biologiques mesurées sur les marqueurs du stress oxydant supportent l'hypothèse d'une génération d'espèces activées de l'oxygène, tandis que des biomarqueurs d'exposition montrent une évolution en relation avec la teneur en haloformes (molécules issues de la réaction des substances hydrocarbonées avec le chlore) de l'eau.

Synthèse & Perspectives

L'ensemble de ces résultats apporte des informations très utiles dans le domaine de la perception du risque et contribue à l'amélioration de l'expertise. En effet, le risque microbiologique, à l'inverse du risque chimique, est difficile à appréhender tant pour la population que pour les opérateurs. Les travaux ont permis dans un certain nombre de situations de bien montrer la réalité du danger et de mieux quantifier le risque pour les consommateurs ou les personnes exposées. Dans ce cadre, les travaux sur les cyanobactéries et leurs toxines sont à la base d'une addition à la réglementation, en particulier pour les eaux de baignade.

L'eau est en effet un domaine fortement réglementé et l'application nationale des directives européennes a conduit à une protection très élevée des consommateurs. La contribution des recherches menées dans ce programme est importante, qu'elles concernent l'exposition liée à la baignade de personnes en bonne santé, ou l'exposition liée aux aérosols de personnes affaiblies séjournant en milieu de soins. Il reste cependant encore à progresser dans ces domaines avant que l'on puisse faire évoluer la réglementation sur des bases pleinement validées de l'évaluation du risque ; mais d'ores et déjà les autorités ont utilisé ces données pour orienter des actions de prévention dans les sites exposés.

La connaissance du risque chimique a bénéficié des résultats du programme, en particulier pour ce qui concerne les sous produits de traitement de désinfection des eaux dans les piscines et l'exposition professionnelle qui en résulte.

Les effets des perturbateurs endocriniens sont encore très mal connus, mais les travaux qui leur ont été consacrés contribuent à sensibiliser les acteurs. De même, le risque sanitaire pouvant résulter des expositions aux produits phytosanitaires présents dans l'eau reste encore largement à évaluer. L'analyse de la toxicité des mélanges complexes et des effets de l'exposition chronique à de faibles doses, plus adaptée aux situations d'exposition rencontrées dans l'environnement général, justifie une intensification de recherche méthodologique, bien que ce besoin ne soit pas spécifique au milieu hydrique.

Le risque lié au relargage de déchets médicamenteux, (hormones, antibiotiques, etc.) dans l'environnement est une préoccupation croissante parfaitement illustrée par la multiplication de souches résistantes aux antibiotiques dans l'environnement, sans pour autant que l'ensemble des mécanismes mis en jeu soit parfaitement identifié.

Il reste bien sûr encore de vastes domaines à explorer. On peut citer l'évolution de la virulence des pathogènes existants ou l'émergence de nouveaux pathogènes qui peuvent résulter notamment de la multiplication des interactions chimie-microbiologie dans l'environnement, de changements climatiques, de l'émergence de nouvelles technologies. Un renforcement des recherches dans le domaine de l'écologie bactérienne est donc nécessaire pour mieux appréhender la menace en terme de santé humaine. Ce domaine de recherche ne doit pas se limiter aux seules populations bactériennes, si l'on tient compte du fait qu'environ 44 % des pathogènes émergents sont des virus (*revue OMS, 2003, Emerging issues in water and infectious disease, ISSN 1728-2160*) Taylor et al., 2001).

Résumés des projets

Évaluation de la détection moléculaire des entérovirus comme marqueur de pollution virale des eaux de surface

Laurent Andréoletti et al., 1998

L'objectif de ce travail a été de déterminer si les concentrations des coliphages somatiques (virus infectant des bactéries), des entérovirus infectieux, ou la détection du génome des entérovirus était associée à la présence d'une pollution des eaux de surface par des virus entériques pathogènes.

Quatre rivières françaises ont été prélevées tous les mois ou tous les quinze jours afin de réaliser une détection quantitative des coliphages somatiques, des entérovirus infectieux et une détection moléculaire qualitative du génome des entérovirus, de l'hépatite A, des virus de Norwalk, des astrovirus et des rotavirus.

Tous les échantillons (68) prélevés au cours de cette étude se sont révélés positifs pour la détection des coliphages somatiques. Les entérovirus infectieux n'ont pu être isolés par culture cellulaire que dans seulement 3 % des échantillons testés, alors que le génome de ces virus a été détecté dans 88 % de ces mêmes échantillons. Une détection positive du génome du virus de l'hépatite A, de celui des virus de Norwalk, des astrovirus et des rotavirus a été observé respectivement dans 1,5 %, 1,5 %, 3 %, et 0 % des 68 échantillons d'eaux testés, alors qu'un seul d'entre eux avait révélé la présence de particules infectieuses par culture cellulaire (souche vaccinale de Poliovirus Sabin 3).

Aucune corrélation statistiquement significative n'a été mise en évidence entre les niveaux de concentration des coliphages somatiques et la détection moléculaire positive d'un virus entérique pathogène dans les eaux de surface testées.

Nos travaux indiquent que les niveaux de concentration des coliphages somatiques et des entérovirus infectieux détectés par des techniques classiques de culture, ne sont pas des indicateurs adaptés à l'évaluation des risques de pollution virale des eaux de surface par des virus entériques pathogènes. Ces deux marqueurs préconisés comme paramètres d'évaluation de la pollution virale des eaux (normes européennes en vigueur) ne seraient pas adaptés au contrôle des eaux de surface récréatives ou destinées à la conchyliculture.

Des études complémentaires permettront de préciser s'il s'avère adapté de remplacer ces tests par des techniques moléculaires quantitatives de détection du génome des entérovirus.

Publication issue de ce projet

Hot D, Legeay O, Jacques J, Gantzer C, Caudrelier Y, Guyard K, et al. Detection of somatic phages, infectious enteroviruses and enterovirus genomes as indicators of human enteric viral pollution in surface water. *Water Res* 2003;37(19):4703-10.

Les *Aeromonas* mésophiles indicateurs possibles de la qualité microbiologique des eaux

Bernard Baleux et al., 1997

Ce projet visait à évaluer le niveau de présence d'*Aeromonas spp.* Dans différents types d'eaux plus ou moins contaminées par l'activité humaine et de comparer les caractères biochimiques de souches environnementales avec ceux des souches cliniques.

L'étude a porté sur des échantillons prélevés mensuellement sur une année en milieu continental (6 sites) et marin (4 sites) du département de l'Hérault. La présence d'*Aeromonas* dans les eaux a toujours été positive quelle que soit la saison. Les abondances fluctuant de quelques unités en milieu marin en période estivale indemne de contamination (coliformes thermotolérants) à $1,8 \times 10^7$ /100 ml dans les eaux d'un fleuve côtier en aval du rejet d'une station d'épuration des eaux usées.

Une méthode de classification développée dans le cadre de cette étude a permis de décrire neuf espèces d'*Aeromonas* à partir de 972 souches d'origine aquatiques : *A. sobria* - *A. veronii biotype sobria* (HG7/8) (23,2 %), *A. caviae* (HG4) (21,2 %), *A. hydrophila* - *A. bestiarum* (HG1/2) (19,6 %), *A. jandaei* (HG9) (15,5 %), *A. veronii biotype veronii* (HG10) (2 %), *A. trota* (HG13) (1,3 %), *A. eucrenophila* (HG6) (1,3 %), *A. schubertii* (HG12) (0,5%), *A. encheleia* (HG11) (0,3 %). Les espèces dominantes dans les eaux, tous sites de prélèvements et toutes périodes confondues, sont *A. sobria* - *A. veronii/sobria* (HG7/8), *A. caviae* (HG4), *A. hydrophila* - *A. bestiarum* (HG1/2) dans l'ordre décroissant des abondances.

A partir de 57 souches d'*Aeromonas* d'origines hospitalières identifiées au niveau de l'espèce, par la même technique que celle utilisée pour les souches d'origines aquatiques, seulement 3 espèces ont été décrites, *A. caviae*, *A. hydrophila*, *A. sobria*, dans l'ordre décroissant des abondances. La diversité spécifique des *Aeromonas* d'origines aquatiques est élevée au mois de mai (9 espèces) et faible au mois de juillet (4 espèces, *A. sobria* - *A. veronii/sobria* (38 %), *A. hydrophila* - *A. bestiarum* (31 %), *A. jandaei* (11 %) et *A. eucrenophila* (0,4 %) soit deux espèces dominantes communes avec celles qui sont isolées en milieu hospitalier.

En l'absence d'un modèle animal reconnu par la communauté scientifique, l'évaluation de la pathogénie des souches appartenant aux différentes espèces d'*Aeromonas* a été réalisée par des tests in vitro (recherche d'une activité hémolytique et test d'adhésion cellulaire). 57 % des 972 souches d'origines aquatiques sont hémolytiques et le pourcentage le plus élevé se situe au mois de juillet (87,7 %) et le plus faible au mois de mars (37,3 %). Parmi les espèces identifiées, ce sont *A. hydrophila* - *A. bestiarum* et *A. sobria* - *A. veronii biotype sobria* qui possèdent le plus souvent le caractère hémolytique (environ 90 %) alors que ce caractère n'est positif que dans 12 % des souches *A. caviae* et 15,4 % des souches *A. trola*.

Par ailleurs, 90,7 % des 174 souches d'*Aeromonas* d'origines aquatiques, sur lesquelles a été effectué le test d'adhésion cellulaire, répondent positivement à ce test. Ce pouvoir d'adhésion est présent dans la totalité des souches de l'espèce *A. jandaei*. Il s'exprime à un haut niveau pour les souches appartenant aux espèces *A. hydrophila* - *A. bestiarum* (98,4 %) et *A. sobria* - *A. veronii biotype sobria* (95,2 %), à l'inverse de l'espèce *A. caviae* dans laquelle seulement 11,2 % des souches sont adhérentes.

Les antibiogrammes réalisés sur les 972 souches d'*Aeromonas* aquatiques indiquent que les souches d'origine aquatique présentent un même profil de sensibilité ou de résistance aux antibiotiques que les souches d'origines hospitalières. La capacité de survie en fonction des conditions environnementales (ici, l'exposition solaire) est également comparable pour les souches testées pour ce critère.

Les résultats de cette étude, en concordance avec ceux de nombreux travaux cités dans la littérature, permettent de proposer la recherche et la quantification des *Aeromonas* mésophiles comme marqueur de la qualité bactériologique des eaux, qualification assurée non plus par un témoin de contamination fécale ("bactérie indicatrice") mais par une bactérie pathogène.

Evaluation du risque sanitaire de cryptosporidiose par l'étude des réponses lymphocytaire T à des cibles immunodominantes de souches pathogènes de *Cryptosporidium parvum* d'origine hydrique Jean-Jacques Ballet et Philippe Brasseur et al., 1998

Cryptosporidium parvum est un protozoaire parasite de l'homme et de l'animal. Chez l'homme sain, il provoque des diarrhées qui guérissent spontanément. A l'inverse, chez les sujets porteurs d'un déficit immunitaire impliquant en particulier les lymphocytes T (LT), il est responsable de diarrhées chroniques graves menaçant le pronostic vital. Partout dans le monde, *C. parvum* est un problème majeur de santé publique en raison de nombreuses épidémies de cryptosporidiose d'origine hydrique. Il n'existe actuellement aucun traitement spécifique de la maladie. Le site principal de l'infection est la muqueuse intestinale. Un oocyste libère dans l'intestin 4 sporozoïtes qui vont infester les cellules entérocytaires de l'intestin. On connaît l'implication des LT des formations lymphoïdes de l'intestin (plaques de Peyer ou équivalents), particulièrement les LT-CD4+ qui, activés par *C. parvum*, conduisent à la synthèse d'effecteurs lymphocytaires contribuant à la protection contre le parasite.

Ce projet avait pour objectif principal de caractériser au niveau moléculaire les constituants majeurs de *C. parvum* isolés dans les eaux de l'environnement impliqués dans les réponses par les LT, et susceptibles d'entraîner une protection immunologique chez l'homme. Nous avons d'abord amélioré les méthodes de comptage et d'isolement des oocystes de l'eau, ainsi que l'évaluation de leur pouvoir infestant dans un modèle animal. Ensuite, nous avons évalués les réponses des LT humains aux constituants parasitaires in vitro à l'aide de lignées de cellules entérocytaires et in vivo grâce à un modèle animal immunodéficient.

Nous avons ainsi établi que l'oocyste et le sporozoïte portent des structures antigéniques majeures pour l'activation des LT humains. Nous avons étudié in vitro la réponse proliférative des cellules LT de donneurs sains et de donneurs atteints d'hémochromatose en présence de différents fragments protéique (peptides) issus d'une glycoprotéine spécifique du sporozoïte. Les réponses prolifératives obtenues avec ces différents peptides montrent une grande hétérogénéité de la réponse ce qui pourrait s'expliquer par l'hétérogénéité des molécules présentatrices d'antigène.

Chez la souris immunodéficiente non sevrée, l'étude séquentielle au cours du premier mois de vie de la réponse in vitro aux antigènes d'oocystes des LT des compartiments muqueux (follicules lymphoïdes intestinaux) et systémique (rate), a montré que la permisivité à plusieurs isolats (d'origine animale ou humaine) des souriceaux diminuait progressivement en fonction du peuplement par les LT. On observe aussi que le peuplement en LT de la rate et des follicules lymphoïdes intestinaux est altéré de façon durable lorsque *C. parvum* a été administré en période néo-natale. Ces perturbations peuvent être rapprochées des manifestations digestives rapportées chez l'homme, en particulier chez l'enfant malnutri, et justifient leur exploration que nous poursuivons actuellement.

La modulation des réponses des LT par l'environnement muqueux intestinal a été étudiée in vitro par l'influence de l'infection à *C. parvum* sur la sécrétion de différents médiateurs protéiques (cytokines, facteur de croissance, ...). Les données suggèrent que des chémokines (cytokines chemotactiques) et/ou le TGF- β (Transforming growth factor-béta) d'origine entérocytaire sont impliqués dans le déclenchement et la régulation de la réponse muqueuse à l'infection par *C. parvum*.

Ce travail ouvre la voie à la préparation d'oocystes et de fractions protéiques à des fins d'immunisation chez l'animal et chez l'homme pour assurer une protection. Les modèles développés permettent d'entrevoir les mécanismes immunitaires et/ou inflammatoires et leurs rapports avec la malnutrition et certains troubles fonctionnels digestifs chez l'homme.

Publications issues de ce projet

Gargala G, Delaunay A, Li X, Brasseur P, Favennec L, Ballet JJ. Efficacy of nitazoxanide, tizoxanide and tizoxanide glucuronide against *Cryptosporidium parvum* development in sporozoite-infected HCT-8 enterocytic cells. *J Antimicrob Chemother* 2000 ; 46(1):57-60.

Gargala G, Delaunay A, Favennec L, Brasseur P, Ballet JJ. Enzyme immunoassay detection of *Cryptosporidium parvum* inhibition by sinefungin in sporozoite infected HCT-8 enterocytic cells. *Int J Parasitol* 1999; 29 (5):703-9.

Maillet C, Gargala G, Delaunay A, Ducrotte P, Brasseur P, Ballet JJ, et al. *Cryptosporidium parvum* infection stimulates the secretion of TGF-beta, IL-8 and RANTES by Caco-2 cell line. *Parasitol Res* 2000;86(12):947-9.

Mariotte D, Comby E, Brasseur P, Ballet JJ. Kinetics of spleen and Peyer's patch lymphocyte populations during gut parasite clearing in *Cryptosporidium parvum* infected suckling mice. *Parasite Immunol* 2004; 26 (1):1-6.

Delaunay A, Gargala G, Li X, Favennec L, Ballet JJ. Quantitative flow cytometric evaluation of maximal *Cryptosporidium parvum* oocyst infectivity in a neonate mouse model. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66 (10):4315-7.

Recherche et quantification de virus entériques humains dans des boues de station d'épuration

Mesure de leur inactivation après traitement des boues en vue de leur valorisation agricole

Sylviane Billaudel et al., 1997

Notre consommation d'eau augmentant très régulièrement le recyclage rapide des eaux usées devient nécessaire. Le traitement de ces eaux va générer des sous-produits, les boues. Ces boues contiennent nécessairement de grandes quantités de micro-organismes, et sont par ailleurs très instables et malodorantes. La quantité produite journalièrement est trop importante pour envisager leur stockage en décharge.

Ces boues contiennent des matières organiques qui peuvent servir d'engrais pour l'agriculture. Le législateur a préconisé l'utilisation réglementée (arrêté du 8 janvier 1998) de ces boues après hygiénisation. Les procédés permettant cette hygiénisation sont nombreux et ont pour but de stabiliser les boues et d'inactiver les micro-organismes présents.

Les virus présents dans les boues sont très nombreux, plus de 140 espèces. Ils proviennent des intestins humains et animaux. Ces virus, qui comprennent des virus responsables de gastro-entérites, de syndromes méningés, de l'hépatite A et d'autres pathologies, sont parmi les plus résistants à l'inactivation. Le législateur a imposé la recherche de l'activité infectieuse des virus en les cultivant sur des cellules bien définies. Or, de nombreux types viraux parmi les 140 présents ne se cultivent pas sur cellules. Ils ne sont détectables que par la caractérisation de leur génome, grâce à des techniques de biologie moléculaire. Sur culture cellulaire ne sont donc recherchés que certains virus cultivables comme les entérovirus (groupe viral représentatif choisi par le législateur comme indicateur de contamination fécale virale). Or, ces entérovirus sont très nombreux et leur recherche n'est pas exhaustive puisque quelques types ne se multiplient pas sur le système cellulaire disponible.

Ce projet avait pour objectif principal la mise au point d'une technique qui permette la recherche de tous les entérovirus. Nous avons ainsi défini un procédé dit d'extraction-élution des virus des boues qui permet, à la fois, la mise en évidence des génomes d'entérovirus et celle des particules infectieuses. Ainsi, un criblage peut être réalisé par la

recherche des génomes viraux. Lorsque ceux-ci sont détectés, leur caractère infectieux est ensuite confirmé par culture cellulaire. Nous avons, aussi, appliqué cette recherche au virus de l'hépatite A, sans toutefois vérifier le caractère infectieux des génomes, en raison de l'extrême difficulté de culture de ce virus.

Pendant plus d'un an, ce procédé de détection a été employé pour évaluer la qualité du processus d'hygiénisation utilisé par différentes usines de traitement des boues.

Nous avons pu montrer que la technique de chaulage qui porte les boues sous agitation à un pH très basique (supérieur à 12) est un bon procédé, de même que le compostage si la température se maintient entre 55 et 70°C en tous points du processus. Le conditionnement thermique (195°C, 100 minutes sous 21 bars de pression) est le procédé le plus efficace mais le plus coûteux. Enfin, la digestion anaérobie mésophile qui consiste en une digestion bactérienne des matières à 30-37°C pendant 23 jours ne permet qu'un abattement partiel des virus.

Nous avons poursuivi l'application de notre technique à l'évaluation d'un processus de compostage choisi par une petite station, lors d'une étude dirigée par les deux régions Bretagne et Pays de Loire. Très récemment, nous avons adapté les aspects méthodologiques de ce travail à la détection et quantification des Astrovirus dans différents types d'eau (dont des eaux usées) et dans des coquillages.

Publications issues de ce projet

Monpoeho S, Dehee A, Mignotte B, Schwartzbrod L, Marechal V, Nicolas JC, et al. Quantification of enterovirus RNA in sludge samples using single tube real-time RT-PCR. *Biotechniques* 2000; 29 (1):88-93.

Monpoeho S, Maul A, Mignotte-Cadiergues B, Schwartzbrod L, Billaudel S, Ferre V. Best viral elution method available for quantification of enteroviruses in sludge by both cell culture and reverse transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol* 2001;67 (6): 2484-8.

Delabre K, Zanelli F, Teulière F, Monpoeho S, Ferre V, De Roubin M. Use of a molecular method in a routine laboratory. Example of the detection of viruses from sludge samples. In: *Water Quality technology conference; 2002 10-14 novembre 2002; SEATTLE; 2002.*

Monpoeho S, Maul A, Bonnin C, Patria L, Ranarijaona S, Billaudel S, et al. Clearance of human pathogenic viruses from sludge: study of four stabilization processes using real-time RT-PCR and cell culture. *Appl Environ Microbiol* 2004;(in press).

Contrôle rapide de l'efficacité de la désinfection des eaux potables par le chlore

Jean-Claude Block et al., 1999

Le contrôle de la qualité microbiologique des eaux de distribution publique utilise une numération des bactéries coliformes et des bactéries hétérotrophes aérobies et anaérobies avec les méthodes de mesures traditionnelles par culture sur milieux gélosés nutritifs. La mise en évidence de bactéries plus ou moins adaptées au milieu de culture utilisé dans les laboratoires passe de fait par une méthode visuelle (observation à l'oeil de la formation d'une colonie bactérienne) qui implique un nombre de divisions cellulaires élevé et par corollaire un temps d'incubation relativement long (au moins 24 heures sinon 72 heures, ou, pour des aspects non routiniers, 10 à 15 jours d'incubation). D'autres méthodes développées ces dernières années pour le dénombrement des bactéries viables ne traduisent pas directement la viabilité d'une bactérie mais simplement une activité métabolique de la bactérie. De fait il n'existe à l'heure actuelle aucune méthode simple et rapide permettant de contrôler la qualité microbiologique des eaux potables en sortie de filière de traitement, garantissant au producteur une sécurité et une surveillance en ligne. De plus, la question du choix de la dose de désinfectant efficace à maintenir en réseau de distribution par exemple est loin d'être réglée car le gestionnaire manque d'éléments probants de décision.

Pour répondre à ces différentes limitations nous avons exploité une observation réalisée lors du comptage des cellules bactériennes des eaux après marquage par le fluorochrome DAPI (4'-6-diamidino-2-phénylindole) pour développer une technique d'énumération rapide. En effet, il apparaît que la chloration des bactéries (que se soit dans des eaux de distribution ou sur des souches de laboratoire) entraîne un mauvais marquage des cellules bactériennes par le DAPI. Ces bactéries chlorées peu fluorescentes apparaissent de couleur pâle voir légèrement jaune lorsqu'elles sont observées sous lumière U.V. contrairement à la fluorescence plus classique bleue intense des bactéries intactes.

Aussi, nous avons cherché à :

- Développer cette technique de numération bactérienne des eaux potables par marquage cellulaire associé à un comptage microscopique dans le cadre d'un contrôle rapide de la désinfection des eaux potables par le chlore.
- Démontrer que des cellules bactériennes très abîmées par la désinfection et identifiées comme telles par la technique de marquage sont incapables de réparer les lésions causées par la chloration.
- Définir une relation dose (chlore) - effet (désinfection réellement efficace).

Cependant, l'utilisation du DAPI présentent deux inconvénients : un comptage fastidieux et des résultats pouvant varier selon l'observateur. Ce programme a permis d'étudier l'effet de la chloration des bactéries sur le marquage par des fluorochromes en utilisant un cytomètre en flux (appareil de comptage et de tri de cellule en fonction de la fluorescence) afin de mettre en place un contrôle simple et rapide de l'efficacité de la désinfection des eaux potables par le chlore. La mise au point de cette nouvelle méthode a révélé qu'il était possible, en combinant marquage par fluorochromes et cytométrie en flux de réaliser un contrôle rapide de la désinfection (inférieur à une heure). Il est possible par ailleurs, (i) d'accéder à des mesures objectives de cellules bactériennes des échantillons d'eau potable par marquage avec plusieurs fluorochromes, et (ii) de définir un traitement de chloration des eaux permettant d'inactiver les bactéries.

Trois axes de recherche restent à étudier pour compléter notre démarche :

- Maîtriser le sens et la signification du signal de fluorescence et de diffusion de la lumière pour des particules (bactéries) dont la taille, dans les eaux potables, est inférieure ou égale à 1 µm.
- Comprendre la viabilité des populations dites HNA et LNA exposées au chlore.
- Confirmer que la perte de fluorescence des bactéries marquées par un fluorochrome après chloration traduit la présence de lésions irréversibles (i.e. non réparables) et de fait la mort de la cellule bactérienne.

Ces trois points font actuellement l'objet d'études dans le cadre d'un projet de recherche soutenu par la Commission Européenne

Etude de la viabilité et du typage génétique des oocystes de *Cryptosporidium* et des kystes de *Giardia* d'origine hydrique

Alain Bonnin A & Marie Renée Deroubin MR et al., 1996

Plusieurs parasites intestinaux éliminés dans le milieu extérieur par les matières fécales d'hommes ou d'animaux infectés peuvent souiller les eaux d'environnement. Ces parasites hydriques sont susceptibles de contaminer les eaux d'alimentation distribuées au robinet, provoquant ainsi des épisodes de diarrhée et/ou de vomissement parfois épidémiques. Les parasites les plus souvent impliqués en Europe dans ce type de manifestation sont *Cryptosporidium parvum* et *Giardia intestinalis*.

La prévention de ces maladies impose une surveillance étroite des eaux d'environnement et des eaux d'alimentation distribuées au robinet. Une telle surveillance nécessite des méthodes précises pour :

- Identifier les parasites dans l'eau ;
- Déterminer leur viabilité : des parasites morts ne peuvent pas être contaminants ;
- Préciser leur origine, humaine ou animale : en fonction de cette origine, les mesures de prévention à mettre en place sont en effet différentes.

L'objectif de ce programme de recherche était de développer de telles méthodes. Trois laboratoires, spécialisés dans le traitement et la distribution des eaux d'alimentation, la biologie de *Cryptosporidium parvum* et la biologie de *Giardia intestinalis* ont décidé d'unir leurs efforts pour mettre au point des techniques appropriées. Les premiers travaux ont porté sur des échantillons d'eau enrichis artificiellement en parasites. Secondairement, les méthodes développées ont été appliquées à des échantillons d'eaux naturelles.

Les méthodes de purification et de détection de *Giardia intestinalis* mises au point au cours de ce programme n'ont pas permis la détection de ce parasite dans l'eau. En revanche, un ensemble de techniques permettant d'identifier *Cryptosporidium parvum* dans l'eau, de préciser son origine humaine ou animale, et de déterminer sa viabilité a été mis au point et appliqué avec succès à un échantillon d'eau naturellement infecté prélevé dans l'environnement. Cette méthode est en cours de validation sur un grand nombre d'échantillons afin d'être utilisée dans la surveillance des eaux naturellement contaminées.

Etude du caractère pathogène et de la sensibilité aux imidazolés d'isolats de *Giardia* d'origine hydrique

Philippe Brasseur et al., 1997

La contamination de l'homme par des parasites est devenue un problème de santé publique en raison de la survenue de nombreuses épidémies ayant pour origine une contamination par l'eau. *Giardia* est un protozoaire parasite existant dans l'intestin des malades. Il peut donner des formes très résistantes, les kystes, qui éliminés dans le milieu extérieur peuvent se transmettre à l'homme par ingestion d'eau ou d'aliments souillés. Entre 1946 et 1980, 42 épidémies de

Giardia ont été recensées aux Etats-Unis. Ce projet visait à étudier la viabilité et le pouvoir pathogène des kystes de *Giardia* provenant de selles de malades et isolés dans l'eau.

Des kystes de *Giardia* ont été isolés chez 23 malades hospitalisés dans différents centres hospitaliers universitaires (Amiens, Dijon, Limoges, Lyon et Rouen). Les pourcentages de kystes viables (détection immunochimique) variaient de 0,25% à 90% (moyenne 45,4%). Le pouvoir pathogène a été déterminé sur un modèle animal, le merion (petit rongeur) par voie orale avec 1000 à 230 000 kystes de *Giardia*. Sur les 23 prélèvements inoculés, 12 n'ont manifesté aucun pouvoir infestant sur l'animal.

Nous avons pu observer qu'il n'existait aucune corrélation entre le nombre de kystes viables ingérés et le pouvoir pathogène pour l'animal. Avec ingestion de 92 000 kystes viables, aucun animal n'a été infesté alors que seulement 80 kystes d'un autre isolat provoquaient l'infestation de tous les animaux. D'autre part, aucune corrélation entre la viabilité des kystes et l'existence de diarrhée chez l'homme qui en était porteur n'a été mise en évidence. Ces différences observées pourraient être dues au polymorphisme qui existe au sein de l'espèce *Giardia duodenalis*. L'étude moléculaire des gènes de kystes qui permet de les classer en différents groupes a montré que deux génotypes différents étaient représentés dans les isolats.

Concernant l'eau de distribution, aucun kyste de *Giardia* n'a été trouvé après filtration de 15 échantillons de 100 litres d'eau de distribution, en revanche sur les 6 prélèvements effectués à la sortie d'une station d'épuration en Haute Normandie, 5 étaient positifs, mais avec des concentrations faibles (4 à 8 kystes/litre). Les eaux de la Seine prélevées sur 7 sites en aval et en amont de Rouen ne contenaient aucun kyste.

La sensibilité de *Giardia duodenalis* aux différents médicaments imidazolés utilisés pour traiter les pathologies associées a été testée, via un modèle animal. Certaines souches sont apparues résistantes aux traitements communément employés.

Les différentes mises au point méthodologiques réalisées au cours de ce projet (purification de kystes isolés, modèle animaux pour apprécier le caractère pathogène et la sensibilité aux différents dérivés imidazolés, génotypage des isolats) contribuent à l'amélioration de la surveillance sanitaire des eaux et à l'amélioration du traitement des malades.

Publications issues de ce projet

Lemee V, Zaharia I, Nevez G, Rabodonirina M, Brasseur P, Ballet JJ, et al. Metronidazole and albendazole susceptibility of 11 clinical isolates of *Giardia duodenalis* from France.

J Antimicrob Chemother 2000; 46(5):819-21.

Abboud P, Lemee V, Gargala G, Brasseur P, Ballet JJ, Borsa-Lebas F, et al. Successful treatment of metronidazole- and albendazole-resistant giardiasis with nitazoxanide in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Clin Infect Dis* 2001; 32 (12):1792-4.

***Clostridium botulinum* dans l'environnement et les aliments**

Réservoirs et mécanismes de développement

Véronique Broussolle et al., 1998

La présence de spores de la bactérie pathogène *Clostridium botulinum* dans les sédiments marins constitue une source potentielle de botulisme pour l'homme via la contamination des poissons et des produits de la mer. Suite à un épisode de botulisme aviaire survenu en 1996 sur les côtes du nord de la France, la présence d'un grand nombre de spores de *C. botulinum* dans cette région a été suspectée et l'hypothèse de la contamination des oiseaux par ingestion de poissons contaminés avancée.

Ce projet avait pour objectif d'étudier trois paramètres d'importance pour une meilleure connaissance des expositions et des risques : la présence de spores dans certains aliments et réservoirs de l'environnement ; les mécanismes de développement de spore de *C. botulinum* ; la stabilité de la toxine et l'étude de son passage au niveau de la barrière intestinale.

Au cours de l'étude, la recherche de spores a été entreprise dans des échantillons marins (poissons, coquillages, sédiments ou prélèvements de décharges) en utilisant une nouvelle méthode moléculaire basée sur la mise en évidence des gènes codant pour les toxines produites par l'agent pathogène. Des spores ont été retrouvées dans 14% des échantillons testés avec un faible taux de contamination de 3 à 6 spores par kg. Ce niveau de contamination est faible comparé aux données issues d'autres enquêtes réalisées dans le monde.

Cette méthode de détection par amplification génique est sensible, spécifique du type de toxine produite et permet de préciser si le germe est présent ou non, mais ne donne pas d'indication sur la toxicité de l'échantillon. En effet, pour que la toxine botulique soit produite, il faut que la spore, qui est la forme inactive de la bactérie, germe et se développe dans l'aliment. Nous avons recherché les molécules biologiques qui induisent la germination des spores et mis en évidence le rôle des acides aminés tels que la L-alanine dans ce processus. La vitesse de germination ainsi que le nombre de spores qui germent effectivement dépendent des souches bactériennes considérées dans l'espèce *C. botulinum*. De plus, le mécanisme de germination est complexe et fait intervenir un grand nombre de gènes dont certains ont été étudiés au cours de ce projet. Mais cette étude devra être poursuivie pour tenter d'élucider cette étape du développement qui est particulièrement délicate à prédire.

Enfin, si la spore est présente et germe, une cellule bactérienne va émerger et produire la neurotoxine dans l'aliment : il convient alors d'apprécier cette production, la stabilité de la toxine pendant le transit chez le consommateur ainsi que son passage au niveau de la barrière intestinale. Cette dernière étape a été étudiée sur des lignées de cellules intestinales cultivées in vitro. Ces expériences mettent en évidence un passage transépithélial de la neurotoxine, passage facilité par la présence de protéines non toxiques complexées avec la neurotoxine qui la protègent également lors du passage dans l'estomac de l'homme.

Ce programme a produit des données manquantes et indispensables sur la prévalence de la bactérie pathogène *C. botulinum* dans des produits alimentaires tels que les poissons, qui peuvent être ensuite transformés par de nouveaux procédés technologiques. Toutefois, une évaluation complète et quantitative du risque botulique devrait prendre en compte l'acquisition d'autres données telles que la détermination des paramètres de résistance thermique des bactéries et des effets de la composition de l'aliment sur cette résistance, la détermination des vitesses de croissance de *C. botulinum* dans les aliments et l'étude de l'influence des facteurs contrôlant la croissance. Ces données devront être validées dans plusieurs systèmes alimentaires.

C'est la collecte de ces données et leur intégration dans des modèles et des simulations mathématiques qui permettrait une démarche complète d'évaluation quantitative du risque botulique

Publications issues de ce projet

Fach P, Perelle S, Dilasser F, Grout J, Dargaignaratz C, Botella L, et al. Detection by PCR-enzyme-linked immunosorbent assay of *Clostridium botulinum* in fish and environmental samples from a coastal area in northern France. *Appl Environ Microbiol* 2002;68(12):5870-6.

Alberto F, Broussolle V, Mason DR, Carlin F, Peck MW. Variability in spore germination response by strains of proteolytic *Clostridium botulinum* types A, B and F.

Lett Appl Microbiol 2003; 36 (1):41-5.

Broussolle V, Alberto F, Shearman CA, Mason DR, Botella L, Nguyen-the C, et al. Molecular and physiological characterisation of spore germination in *Clostridium botulinum* and *Clostridium sporogenes*. *Anaerobe*, 2002, 8 (3): 89-100.

***Escherichia coli* pathogènes dans les effluents d'abattoir évaluation du risque pour la santé publique**

Hubert Brugère et al., 2000

(Projet en cours)

Les *Escherichia coli* sont des bactéries pathogènes considérées à l'heure actuelle comme des pathogènes émergents en santé publique. Ils sont à l'origine de véritables épidémies alimentaires dont les plus importantes sont survenues aux Etats-Unis en 1993 et plus récemment au Japon en 1996. Ces bactéries sont à l'origine de diarrhées hémorragiques et dans les cas les plus graves d'insuffisance rénale aiguë parfois mortelle. Les *E.coli* décrits chez l'homme sont également présents dans différentes espèces animales où ils sont le plus souvent présents sans que l'animal présente de symptômes.

Les déjections humaines et animales sont donc fortement contaminées par ces *E.coli* pathogènes qui par ailleurs peuvent persister pendant de longues périodes dans l'environnement. Ainsi les eaux usées pourraient être une source potentielle et non négligeable de la contamination de l'homme et l'épandage des eaux usées des industries agro-alimentaires pourrait se révéler une pratique dangereuse en terme de santé publique.

L'objectif de ce projet est d'établir la prévalence et la persistance dans les eaux usées d'abattoir des souches d'*E.coli* présentant un danger pour la santé publique.

Ainsi cette étude permettra non seulement de comprendre comment ces bactéries peuvent persister et se disséminer dans l'environnement mais également de déterminer précisément les caractéristiques de ces germes pathogènes pour l'homme. Aussi, nous nous proposons d'étudier par des techniques de bactériologie moléculaire, l'apparition de

(projet actuellement poursuivi dans le cadre du PRES 2002)

Plusieurs études épidémiologiques ont montré une augmentation du risque de démence lié à la concentration d'aluminium dans l'eau de boisson. A l'initiation de ce projet, l'analyse des données de suivi à 8 ans d'une cohorte de personnes âgées de 65 ans et plus (cohorte PAQUID) domiciliés en Dordogne et en Gironde a révélé une association significative entre une exposition à des taux élevés d'aluminium dans l'eau de boisson et le risque de maladie d'Alzheimer. Cependant, cette étude comportait plusieurs limites, notamment le nombre de personnes exposées à une forte concentration d'aluminium était faible et, de plus, ces sujets étaient regroupés uniquement dans 4 communes. L'objectif de la nouvelle étude ALMA+ est d'approfondir cette relation entre les minéraux de l'eau de boisson, et en particulier l'aluminium, et la survenue de la maladie d'Alzheimer chez des sujets de plus de 75 ans sur un ensemble de personnes à la fois exposées ou non à des taux élevés d'aluminium dans l'eau. Elle doit ainsi permettre de vérifier si de fortes concentrations d'Aluminium, c'est à dire supérieures à 50 mg par litre d'eau peuvent augmenter le risque de démence. Cette étude a inclus 400 nouvelles personnes exposées à des taux élevés d'aluminium dans 14 nouvelles communes de Dordogne. Ces sujets sont comparés à ceux, dits non exposés, déjà recrutés dans la cohorte PAQUID.

Les premiers résultats sur les données transversales de l'étude ALMA+ n'ont pas permis de mettre en évidence une association entre les fonctions cognitives et l'exposition à l'aluminium dans l'eau.

Ce projet, est toujours en cours puisque qu'il apparaissait important de réaliser un suivi sur plusieurs années. Ce suivi à 3 ans est conduit sur l'ensemble des sujets de l'étude ALMA+, ceci permettant ainsi d'étudier d'une part l'évolution des fonctions cognitives mais également les démences incidentes.

Les sujets seront revus à leur domicile par une enquêtrice psychologue qui remplira avec eux un questionnaire détaillé sur leur consommation d'eau ; ils répondront également à une série de tests psychométriques. Cette étude sera complétée par des données biologiques et génétiques qui seront recueillies auprès de personnes volontaires déjà incluses dans l'étude et ceci afin d'étudier une éventuelle interaction entre des facteurs génétiques et des facteurs environnementaux.

Etude prospective de la contamination parasitaire des eaux de piscines par les microsporidies, *cryptosporidies* et *giardia* Derouin F et al., 1998

L'ingestion accidentelle d'eau lors d'une baignade en piscine peut être associée à un risque de contamination par différents types de microbes. Parmi ceux-ci, plusieurs parasites microscopiques, *Cryptosporidium parvum*, *Giardia intestinalis*, *Cyclospora*, *Entamoeba histolytica* peuvent être responsable de diarrhées sévères chez les malades immunodéprimés, principalement. Or, en France, on ne dispose que de très peu d'information sur le niveau et la fréquence des contaminations parasitaires des piscines.

L'objectif de notre étude a donc été d'estimer cette contamination par une étude suivie de plusieurs piscines parisiennes.

Le travail a été réalisé sur une période de 13 mois, dans 6 piscines parisiennes. Dans chacune d'entre-elles, des prélèvements d'eau ont été effectués à différentes périodes de l'année. Chaque échantillon a été concentré par filtration et la recherche de parasites a été effectuée en utilisant des techniques très sensibles de biologie moléculaire (amplification d'ADN spécifique de chacun des parasites recherchés) et de microscopie.

Deux des 48 échantillons prélevés se sont avérés positifs. L'un contenait un parasite contaminant habituellement les insectes (contamination accidentelle probable par des insectes). L'autre contenait une faible concentration de *Cryptosporidium*, parasite connu pour être responsable de diarrhées chez l'homme. Aucun ne contenait de *Giardia* (autre parasite digestif responsable de diarrhée).

En conclusion, cette étude a retrouvé un niveau très faible de contamination parasitaire des piscines étudiées et semble indiquer une bonne efficacité des procédés de traitement et de filtration de l'eau utilisés dans ces piscines. Certes, la chloration a un effet très limité sur *Cryptosporidium* et sur *Giardia*, mais son association avec la filtration semble compenser ce manque d'efficacité.

Publications issues de ce projet

Fournier S, Liguory O, Santillana-Hayat M, Guillot E, Sarfati C, Dumoutier N, et al. Detection of microsporidia in surface water: a one-year follow-up study. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2000;29(2):95-100.

phénomènes d'échange de gènes à l'origine du pouvoir pathogène de ces bactéries chez l'homme entre les bactéries dans les eaux usées des abattoirs d'animaux de boucherie, non seulement au cours des différentes phases de leur traitement, mais aussi dans les cours d'eau.

Cette étude contribuera à l'évaluation du risque pour la santé publique lié à la dissémination dans l'environnement de ces *E.coli* pathogènes grâce à l'élaboration d'indicateurs de contamination des eaux fiables.

Publications issues de ce projet

Brugère H, Andral B, Bouvet J, Espié E, Leclerc C, Roze S, et al. *Epidémiologie environnementale et alimentaire des Escherichia coli shiga-toxinogènes (STEC). Maisons-Alfort: AFSSA; 2003 avril 2003.*

Périmètre de protection des ouvrages de captage et contamination microbiologique

Michel Buès et al., 1998

L'objectif de notre travail est d'étudier le transport d'un micro-organisme pathogène, *Cryptosporidium parvum*, en milieu poreux saturé à l'aide d'essais en laboratoire. Ce travail se positionne dans une thématique de protection efficace des ressources en eau vis-à-vis de la contamination par des oocystes de *C. parvum*. En effet, ce parasite, qui infecte les mammifères, présente une résistance élevée à la plupart des désinfectants classiquement utilisés dans le traitement de l'eau. Il est rencontré dans les eaux souterraines et est responsable de plusieurs épidémies d'origine hydrique.

Cette étude visait à acquérir de meilleures connaissances sur la capacité de transit et de rétention d'un protozoaire pathogène (*Cryptosporidium parvum*) à travers différents types de sols (aquifères) vers un puits de captage pour l'alimentation en eau potable (AEP).

Cryptosporidium parvum est un protozoaire parasite de la classe des sporozoaires. Il est infectieux pour l'homme, ainsi que pour une quarantaine de mammifères. Son cycle de développement est complexe et comporte une forme enkystée, l'oocyste. Les oocystes sont évacués dans les fèces et correspondent donc à la forme de dissémination. Les oocystes assurent une survie du parasite dans des conditions environnementales défavorables pour la majorité des micro-organismes. Ils présentent, de plus, une forte résistance à la plupart des désinfectants utilisés dans les filières de traitement des eaux. Deux origines de la présence de *C. parvum* dans les eaux souterraines sont avancées :

1. Un transfert à partir des eaux de surfaces vers les eaux souterraines à travers les sédiments.
2. Un transfert à partir d'un sol agricole contaminé vers un aquifère, à travers la zone non-saturée en eau.

La mise en place de périmètres de protection autour de chaque puits de captage d'eau a été légalisée au niveau national en vue de préserver aussi bien la qualité de l'eau que la pérennité de la ressource. Les surfaces à protéger sont définies par le concept de zone de capture indiquant l'aire (ou le volume) concernée par un puits au bout d'un certain temps.

En France, tout risque de pollution doit être éliminé dans la zone correspondant à un temps de transfert au puits de moins de cinquante jours. Cette période est supposée suffisante pour une protection effective des puits vis-à-vis d'une contamination micro-biologique.

Les résultats ont montré que le débit volumique et la granulométrie modifient la rétention du pathogène, mais que d'autres paramètres, probablement d'origines biologiques, semblent également avoir une influence. Ce projet a contribué à la définition de zones de capture réaliste qui dépend bien évidemment des propriétés de l'aquifère et du polluant.

Publications issues du projet

Marly X, Chevalier S, Bues M, Schwartzbrod J, Estevenon O. *Experimental investigations and numerical modelling of Cryptosporidium parvum transport behaviour in aquifers. Water Sci Technol* 2001;43(12):109-16.

Chesnot T, Marly X, Chevalier S, Estevenon O, Bues M, Schwartzbrod J. *Optimised immunofluorescence procedure for enumeration of Cryptosporidium parvum oocyst suspensions. Water Res* 2002;36(13):3283-8.

Marly X, Chevalier S, Buès M, Schwartzbrod J. *Laboratory investigations of Cryptosporidium parvum oocysts adsorption properties. In: Rosbjerg et al., A B, editors. International conference on Groundwater research; 2000 6-8 juin 2000; 2000. p. 43-44.*

La dismatose à *Fasciola hepatica* Linne

Les origines de la contamination humaine dans les cressonnières naturelles et les prairies inondables et la dissémination des parasites flottants

Gilles Dreyfuss et al., 1998

La grande douve du foie (*Fasciola hepatica*) est un parasite des herbivores fréquemment rencontré dans les pays d'élevage du monde entier. L'animal se contamine en broutant de l'herbe portant des kystes parasitaires, surtout en milieu humide. L'homme peut se contaminer en ingérant des végétaux crus poussant dans l'eau ou sur le sol humide : cresson, pissenlit, voire mâche.

Ce parasite nécessite pour assurer son développement l'intervention d'un mollusque aquatique, la limnée (*Galba truncatula*), qui va permettre le déroulement de la vie larvaire de la douve. Ce mollusque produit ainsi des parasites qui vont s'enkyster à la surface des végétaux et devenir infectants pour les mammifères qui les consomment.

Quel que soit ce mammifère, la grande douve se localise dans les canaux biliaires, en occasionnant des troubles hépatiques : douleur, inflammation, mauvais fonctionnement du foie. Chez l'animal de rente, les conséquences économiques peuvent être graves, si le nombre de parasites est élevé il entraîne une mauvaise qualité de la viande ou du lait. Le traitement s'impose dans la majorité des cas. L'homme est peu souvent atteint en région tempérée. En revanche, il l'est beaucoup plus en région chaude, surtout l'enfant. Le traitement de la maladie est parfois délicat, ce qui justifie des mesures de prévention efficaces.

Il est possible de prévenir la maladie en contrôlant les populations de mollusques responsables qui y vivent. Cependant, avant de généraliser ce principe, il était indispensable de conduire une étude des points suivants :

- déterminer les espèces de Mammifères sauvages qui peuvent contaminer ces sites lorsque ces derniers sont à l'écart du bétail ;
- vérifier si des mollusques autres que *Lymnaea glabra* ou *L. truncatula* peuvent assurer la transmission du parasite dans certaines cressonnières ;
- et préciser le devenir des métacercaires (kystes du parasite) flottantes lorsqu'elles sont transportées dans un courant ou lorsqu'elles restent en eau stagnante.

Des investigations de terrain ont été conduites sur une période de deux années dans 52 cressonnières naturelles, situées dans la région du Limousin.

Treize espèces de mammifères et cinq d'oiseaux ont été reconnues dans ces cressonnières. Cette faune est incontrôlable et côtoie couramment les animaux d'élevage et leurs zones d'activité (pâtures, prairies inondables). Elle augmente donc le risque potentiel de contamination de l'homme.

La limnée tronquée est le mollusque habituellement impliqué dans la transmission de la grande douve. Cependant, d'autres espèces peuvent la remplacer en son absence, et maintenir la maladie. Le contrôle de la transmission s'en trouve limité.

Enfin, certains kystes parasitaires infectants ne se fixent pas aux végétaux et peuvent flotter quelque temps à la surface de l'eau. Bien que leur pouvoir contaminant soit plus faible que celui des kystes fixés, ils constituent une possibilité d'extension de la maladie, à la fois par leur dispersion et par l'eau de boisson des animaux.

Publications issues de ce projet

Abrous M, Rondelaud D, Dreyfuss G, Cabaret J. Infection of *Lymnaea truncatula* and *Lymnaea glabra* by *Fasciola hepatica* and *Paramphistomum daubneyi* in farms of central France. *Vet Res* 1999; 30(1):113-8.

Dreyfuss G, Vignoles P, Rondelaud D, Vaille-Morel C. *Fasciola hepatica*: characteristics of infection in *Lymnaea truncatula* in relation to the number of miracidia at exposure. *Exp Parasitol* 1999; 92(1):19-23.

Abrous M, Rondelaud D, Dreyfuss G. Influence of low temperatures on the cercarial shedding of *Paramphistomum daubneyi* from the snail *Lymnaea truncatula*. *Parasite* 1999;6(1):85-8.

Abrous M, Dreyfuss G, Rondelaud D. The ability of eight species of freshwater snails to sustain the larval development of *Paramphistomum daubneyi* Dinnik, either singly or in combination with *Fasciola hepatica* Linné. *Rev Med Vet* 1999; 150(8-9):727-732.

Abrous M, Rondelaud D, Dreyfuss G. Cercarial productivity of redial generations in single-miracidium infections of *Lymnaea truncatula* with *Paramphistomum daubneyi* or *Fasciola hepatica*. *J Helminthol* 2000; 74(1):1-5.

Abrous M, Rondelaud D, Dreyfuss G. A field study of natural infections in three freshwater snails with *Fasciola hepatica* and/or *Paramphistomum daubneyi* in central France. *J Helminthol* 2000; 74(3):189-94.

Dreyfuss G, Abrous M, Rondelaud D. The susceptibility of *Lymnaea fuscus* to experimental infection with *Fasciola hepatica*. *J Parasitol* 2000; 86(1):158-60.

Dreyfuss G, Vignoles P, Rondelaud D. Variability of *Fasciola hepatica* infection in *Lymnaea ovata* in relation to snail population and snail age. *Parasitol Res* 2000; 86(1):69-73.

Rondelaud D, Dreyfuss G, Bouteille B, Darde ML. Changes in human fasciolosis in a temperate area: about some observations over a 28-year period in central France. *Parasitol Res* 2000; 86(9):753-7.

Abrous M, Vaille-Morel C, Rondelaud D, Dreyfuss G, Cabaret J. Metacercarial aggregation in *Digenea* (*Fasciola hepatica* and *Paramphistomum daubneyi*): environmental or species determinism? *J Helminthol* 2001; 75(4):307-11.

Abrous M, Rondelaud D, Dreyfuss G. The stress of *Lymnaea truncatula* just before miracidial exposure with *Fasciola hepatica* increased the prevalence of infection. *Exp Parasitol* 2001; 99(1):49-51.

Rondelaud D, Vignoles P, Abrous M, Dreyfuss G. The definitive and intermediate hosts of *Fasciola hepatica* in the natural watercress beds in central France. *Parasitol Res* 2001; 87(6):475-8.

Dreyfuss G, Vignoles P, Abrous M, Rondelaud D. Unusual snail species involved in the transmission of *Fasciola hepatica* in watercress beds in central France. *Parasite* 2002; 9(2):113-20.

Mage C, Bourgne H, Toullieu JM, Rondelaud D, Dreyfuss G. *Fasciola hepatica* and *Paramphistomum daubneyi*: changes in prevalences of natural infections in cattle and in *Lymnaea truncatula* from central France over the past 12 years. *Vet Res* 2002; 33(5):439-47.

Rondelaud D, Abrous M, Dreyfuss G. The influence of different food sources on cercarial production in *Lymnaea truncatula* experimentally infected with *Digenea*. *Vet Res* 2002; 33(1):95-9.

Rondelaud D, Vignoles P, Dreyfuss G. The presence of predators modifies the larval development of *Fasciola hepatica* in surviving *Lymnaea truncatula*. *J Helminthol* 2002; 76(2):175-8.

Vignoles P, Menard A, Rondelaud D, Chauvin A, Dreyfuss G. *Fasciola hepatica*: the characteristics of experimental infections in *Lymnaea truncatula* subjected to miracidia differing in their mammalian origin. *Parasitol Res* 2001; 87(11):945-9.

Vignoles P, Dreyfuss G, Rondelaud D. Redial growth and cercarial productivity of *Fasciola hepatica* in three species of young lymnaeid snails. *J Helminthol* 2002; 76(3):269-72.

Vignoles P, Favennec L, Dreyfuss G, Rondelaud D. Highland populations of *Lymnaea truncatula* infected with *Fasciola hepatica* survive longer under experimental conditions than lowland ones. *Parasitol Res* 2002; 88(4):386-8.

Dar Y, Vignoles P, Dreyfuss G, Rondelaud D. *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*: comparative morphometric studies on the redial stage of both species. *Parasitol Res* 2003; 91(5):369-73.

Vignoles P, Favennec L, Rondelaud D, Dreyfuss G. The experimental production of *Fasciola hepatica* metacercariae from three aquatic populations of *Galba truncatula*. *J Helminthol* 2003; 77(3):275-7.

Détection des contaminants phytosanitaires par utilisation de biocapteurs

Didier Fournier et al., 1998

Ce projet visait à développer une méthode d'identification de produits phytosanitaires dans les eaux, rapide et peu coûteuse. La méthode proposée est basée sur l'utilisation de biocapteurs, ici une famille d'enzyme, les cholinestérases, dont l'activité est inhibée par la présence d'insecticides dans l'échantillon testé.

Le développement de ce test nécessitait une étude des propriétés de l'enzyme afin d'en modifier quelques caractéristiques. Le projet a donc porté sur les points suivants :

Etude préalable de la cinétique de la réaction enzymatique.

Amélioration de la sensibilité de l'enzyme aux insecticides.

Obtention d'une enzyme stable pour permettre l'utilisation du biocapteur longtemps après sa fabrication.

Protection de l'activité de l'enzyme dans l'environnement hostile.

Les acétylcholinestérases utilisées pour ce travail étaient de sources variées (insectes, nématodes, vertébrés...). Les études de structure-fonction avaient permis d'identifier les régions importantes de l'enzyme et de tester un grand nombre de protéines modifiées pour ces régions. Cette stratégie a permis d'obtenir des enzymes très sensibles (jusqu'à 300 000 fois plus sensible que certaines enzymes utilisées jusqu'alors).

Une même stratégie a été utilisée pour obtenir des protéines plus stables vis-à-vis des risques de dénaturations par les solvants organiques, la température et l'urée. Enfin nous avons mis au point une technique d'encapsulation de l'enzyme

au sein de liposomes (vacuoles constituées de couches lipidiques) qui n'affecte pas son activité et la protège d'un environnement hostile (lié par exemple à la composition de l'échantillon contaminé par les pesticides).

Plusieurs biocapteurs ont été testés, avec des enzymes améliorés. L'utilisation de plusieurs enzymes ayant des sensibilités différentes a permis de montrer qu'il était possible de détecter et d'identifier des insecticides de la famille des composés organophosphorés et carbamates comme la toxine naturelle anatoxine-a(s), produite par des cyanobactéries colonisant les eaux douces.

Cependant certaines améliorations sont actuellement en cours pour permettre une commercialisation de ce type de biocapteur.

Publications issues de ce projet

Villatte F, Marcel V, Estrada-Mondaca S, Fournier D. Engineering sensitive acetylcholinesterase for detection of organophosphate and carbamate insecticides. *Biosens Bioelectron* 1998;13(2):157-64.

Boublik Y, Saint-Aguet P, Lougarre A, Arnaud M, Villatte F, Estrada-Mondaca S, et al. Acetylcholinesterase engineering for detection of insecticide residues. *Protein Eng* 2002;15(1):43-50.

Fremaux I, Mazeres S, Brisson-Lougarre A, Arnaud M, Ladurantie C, Fournier D. Improvement of *Drosophila* acetylcholinesterase stability by elimination of a free cysteine. *BMC Biochem* 2002;3(1):21.

Nasseau M, Boublik Y, Meier W, Winterhalter M, Fournier D. Substrate-permeable encapsulation of enzymes maintains effective activity, stabilizes against denaturation, and protects against proteolytic degradation. *Biotechnol Bioeng* 2001;75(5):615-8.

Colletier JP, Chaize B, Winterhalter M, Fournier D. Protein encapsulation in liposomes: efficiency depends on interactions between protein and phospholipid bilayer. *BMC Biotechnol* 2002;2(1):9

Chaize B, Winterhalter M, Fournier D. Encapsulation of acetylcholinesterase in preformed liposomes. *Biotechniques* 2003;34(6):1158-60, 1162

Mesures moléculaires des transferts de contaminations microbiennes dues à l'utilisation en agriculture des boues de station d'épuration

Jean-Jacques Godon et al., 1999

L'épandage des boues de station d'épuration permet une valorisation agricole et une élimination finale de la pollution. Cependant, son impact sur la santé des hommes, des animaux et des plantes est mal connu et suscite des inquiétudes justifiées. D'un point de vue microbiologique, le risque majeur de la pratique d'épandage est de générer des cycles de contamination d'agents infectieux (virus, bactéries ou parasites).

La sécurité microbiologique repose sur des mesures ponctuelles de germes indicateurs dans les différents milieux (ex : aliments, eaux de baignade ou de consommation). Ces mesures ne prennent pas en compte les changements de pratique (gestion des déchets, agriculture, agro-alimentaire, consommateur) inhérents aux sociétés modernes et donc aux émergences associées. L'objectif du programme de recherche a été double : d'une part, mesurer la survie et le transfert vers la plante de certains micro-organismes pathogènes lors de l'épandage de boues et de compost issus de station d'épuration ; d'autre part la possibilité d'utiliser des méthodes moléculaires pour suivre le devenir de certains micro-organismes dans l'environnement.

Ce projet visait à évaluer le risque lié à la survie des bactéries pathogènes (connues) ou potentiellement pathogènes (inconnues) tout au long de la filière : eaux résiduaires urbaines, station d'épuration, boues avec ou sans traitement d'hygiénisation, sol après épandage, végétaux ayant poussé sur ce sol.

La dernière étape, au cours de laquelle les aliments peuvent boucler un cycle de contamination, a fait l'objet d'une attention particulière.

Les difficultés rencontrées lors des mises au point de techniques moléculaires adaptées à l'étude ont été sous-estimées et, de ce fait, n'ont pas produit de résultats concrets. Ces difficultés ne nous ont pas permis de faire un suivi continu au travers des différentes étapes de la filière avec ce type de méthode. Par contre, les résultats de l'étape « sol-plante » sont tout à fait satisfaisants. Trois campagnes d'épandage ont été menées et l'ensemble des travaux réalisés au cours de ce programme de recherche a permis de préciser le transfert et la survie de pathogènes alimentaires sporulés (*Clostridies*) ou non (*Listeria*) dans l'environnement des cultures maraîchères, notamment lors de l'utilisation de fertilisants organiques issus de boues de station d'épuration. Le dénombrement de ces pathogènes par les méthodes classiques (culture) nous a permis de les suivre avec succès tout au long de la culture.

Pour les deux types de pathogènes alimentaires étudiés, le transfert de la contamination des fertilisants organiques vers les sols puis les plantes a été démontré, engendrant un risque pour les consommateurs. La réglementation en vigueur concernant l'épandage de boues de

station d'épuration hygiénisées, telles que le compost, fixe un délai minimum de 10 mois entre l'épandage et la récolte des produits maraîchers. Le risque lié à la présence de bactéries sporulées, telles que les *Clostridies*, est donc important du fait de la très bonne survie des spores dans les sols de culture pendant plusieurs mois, voire plusieurs années, et de leur transfert potentiel aux cultures. En revanche, le risque de contamination des produits maraîchers par des *Listeria* serait minime compte tenu de la forte décroissance des populations de *Listeria* observée dans les sols de culture.

Les résultats montrent, en condition d'expérimentation réelle, (sol cultivé avec soleil, vent, pluie, etc.) que chaque micro-organisme a un potentiel de survie différent dans le sol, et que les feuilles ne permettent pas la survie des micro-organismes testés.

Publications issues de ce projet

Rousellon N, Delgènes J, Godon J. A new real time PCR (TaqMan® PCR) system for detection of the 16S rDNA gene associated with fecal bacteria. *J Microb Method* 2004; 59 pp 15-22.

Mise au point d'outils pour le suivi de la dynamique des peuplements de cyanobactéries et pour l'évaluation du risque toxique

Jean Humbert et al., 2000

La surveillance des cyanobactéries dans les eaux douces de surface (lacs, étangs et retenues de barrage principalement) est désormais une préoccupation importante des gestionnaires et des autorités sanitaires en charge de cette surveillance car ces organismes toxiques semblent proliférer de plus en plus fréquemment dans ces écosystèmes. Cette surveillance est réalisée en deux étapes. La première consiste à évaluer la quantité et la répartition des cyanobactéries présentes dans le plan d'eau alors que la seconde consiste à rechercher si ces cyanobactéries produisent des toxines, puis à identifier et à quantifier ces toxines.

Les techniques actuelles pour évaluer la quantité de cyanobactéries présentes sont très coûteuses en temps car la répartition spatiale de ces micro-organismes est très variable ce qui nécessite de prélever puis de traiter de nombreux échantillons. C'est pourquoi nous avons testé l'utilisation d'un nouvel outil de surveillance permettant d'obtenir instantanément la répartition spatiale et la quantification des cyanobactéries. Cet outil est une sonde immergeable qui permet d'identifier et de quantifier, grâce à leur composition en pigments, les principales classes de micro-organismes photosynthétiques (dont les cyanobactéries). Cette sonde spectrofluorimétrique s'est révélée globalement très performante pour la quantification et pour l'évaluation de la répartition spatiale des cyanobactéries dans différents types plans d'eau. Une bonne corrélation des résultats fournis par la sonde et par les méthodes jusqu'ici classiquement utilisées (comptage au microscope par exemple) a été observée dans la plupart des cas. Seuls quelques problèmes de quantification ont été identifiés avec les espèces de cyanobactéries formant des amas très compacts.

Concernant la recherche puis l'identification et la quantification des cyanotoxines, les principales difficultés rencontrées sont tout d'abord que certaines toxines sont encore actuellement très difficiles à identifier ce qui nécessite l'usage d'appareillages très coûteux, et ensuite qu'il n'existe pas de test simple permettant de savoir rapidement si un risque toxique existe lors de l'apparition d'une prolifération de cyanobactéries. Afin d'améliorer le coût, l'efficacité et la rapidité des méthodes nous avons évalué l'utilisation d'un test de toxicité réalisé sur un petit invertébré, *Artemia salina*.

Les résultats de nos travaux réalisés à partir de toxines purifiées mais aussi d'extraits naturels provenant de proliférations toxiques de cyanobactéries ont malheureusement montré que ce test sur crustacé s'avère de spécificité variable non seulement en fonction de la classe de toxine considérée (hépatotoxines ou neurotoxines), mais aussi en fonction de la nature chimique des toxines au sein d'une même classe. Pour une estimation plus fine et plus spécifique de la toxicité potentielle lors d'une prolifération de cyanobactéries, l'utilisation d'outils permettant d'identifier les mécanismes d'actions cellulaires est à envisager.

Il convient donc de n'utiliser ce test sur *Artemia salina* que dans le cadre d'une première évaluation de la toxicité résultant d'une prolifération de cyanobactéries car il est d'un coût modique et qu'il peut permettre de détecter la plupart des hépatotoxines.

Au travers de ce projet, une amélioration importante des outils de surveillance des cyanobactéries à disposition des autorités sanitaires a pu être apportée. La sonde spectrofluorimétrique testée est désormais utilisée en routine dans le cadre de la surveillance de plusieurs grands lacs français. Ces bons résultats ont par ailleurs motivé d'autres sociétés (dont des sociétés françaises) à développer ce même type d'outils.

Publications issues de ce projet

Bernard C, Harvey M, Briand JF, Bire R, Krysz S, Fontaine JJ. Toxicological comparison of diverse *Cylindrospermopsis raciborskii* strains: evidence of liver damage caused by a French *C. raciborskii* strain. *Environ Toxicol* 2003;18(3):176-86.

Fessard V, Bernard C. Cell alterations but no DNA strand breaks induced in vitro by cylindrospermopsin in CHO K1 cells. *Environ Toxicol* 2003;18(5):353-9.

Jacquets S, Briand JF, Le Boulanger C, Avois-Jacquet C, Oberhaus L, Tassin B, et al. The proliferation of the toxic cyanobacterium *Planktothrix rubescens* following fertilization of the largest natural french lake (lake Bourget). *Harmful algae* 2004; sous presse.

Le Boulanger C, Dorigo U, Jacquets S, Le Berre B, Paolini G, Humbert JF. Application of a submersible spectrofluorometer (FluoroProbe) for rapid monitoring of freshwater cyanobacterial blooms : a case study. *Aquat. Microbial. Ecol.* 2002 ; 30,(1) 83-89.

Développement et validation d'outils moléculaires pour l'identification des cyanobactéries potentiellement toxiques dans l'environnement

Isabelle Itean et al., 1999

Les cyanobactéries, autrefois appelées algues bleues, sont des microorganismes capables de survivre et de s'adapter à nombreux écosystèmes en particulier aquatiques. Outre l'impact écologique, les cyanobactéries peuvent présenter une toxicité (hépatotoxines ou neurotoxines) particulièrement préoccupante lors de proliférations à la surface des étendues d'eau. De nombreuses études ont en effet montré leur impact sur la mortalité des poissons ou encore sur la faune terrestre telle que les bovins venus s'abreuver. D'autres travaux ont mis en évidence leurs effets néfastes sur la santé humaine. Cet aspect a d'autant plus alerté les gestionnaires et professionnels de l'eau que ces proliférations deviennent plus importantes et fréquentes au sein d'étendues d'eau polluées et eutrophes. (eau faiblement oxygénée, résultat de pollutions organiques)

L'identification des cyanobactéries ne peut être réalisée que par des laboratoires spécialisés en raison du peu de caractères physiologiques discriminants, de leur variabilité morphologique et de l'extrême complexité de leur taxonomie. L'étude a été donc conduite dans le but de développer des outils moléculaires accessibles à des non-spécialistes afin d'identifier les cyanobactéries potentiellement toxiques de manière sensible et spécifique.

Par l'analyse de la séquence du gène rrs, commun aux cyanobactéries mais présentant un polymorphisme de séquence suivant le genre de la bactérie, nous avons pu développer des outils moléculaires spécifiques de chacun des trois genres *Microcystis*, *Planktothrix*, le complexe *Anabaena/Aphanizomenon* et *Gomphosphaeria*.

Le couplage de ces outils moléculaires avec des outils immunochimiques a permis d'augmenter la sensibilité des tests de détection. Ces méthodes moléculaires peuvent donc être effectuées soit en complément d'analyse microscopique soit aisément comme seul moyen de détection de ces organismes en eaux douces.

Des applications très larges sont envisageables, comme par exemple un suivi de la dynamique des populations de cyanobactéries plus rigoureux et précis dans le temps, amenant un diagnostic précoce. De plus, l'utilisation de ces techniques très sensibles, par les responsables de l'environnement ou de la santé publique et vétérinaire, permettrait d'anticiper l'apparition des efflorescences dans les eaux à usage récréatif ou de distribution et de protéger efficacement la population.

Etude des virus à transmission entérique dans les eaux de l'environnement

Marie-Edith Lafon et al., 1999

La qualité des eaux environnementales est très strictement surveillée, à l'aide de marqueurs biochimiques et bactériologiques. Les autorités sanitaires de la Gironde ne disposaient d'aucune donnée concernant la présence de virus dans les eaux de baignade de ce département, pour lequel le tourisme représente une importante activité économique. Nous avons développé ce projet afin d'apporter les éléments nécessaires à une meilleure appréciation des risques microbiologiques encourus lors de baignade.

La culture de virus à partir de prélèvements environnementaux est très délicate. Nous avons appliqué des méthodes moléculaires (recherche de gènes des virus et non de particules virales infectieuses) pour conduire une étude virologique qui avait pour objectifs : (i) estimer la fréquence (prévalence) de certains virus dans les eaux de l'environnement en Aquitaine ; (ii) estimer la persistance virale dans un même prélèvement au cours du temps et mettre au point pour les entérovirus (contaminants majeurs des eaux), une méthode quantitative de mesure ; (iii) comparer les souches de calicivirus (norovirus en particulier) détectées dans nos prélèvements et dans les selles de patients, avec les souches pathogènes décrites par ailleurs (épidémiologie moléculaire).

Les prélèvements ont été réalisés par les techniciens de la DDASS de la Gironde pendant l'été 1999 dans des aires de baignade puis testés pour la présence d'entérovirus, norovirus, virus de l'hépatite A, rotavirus. Ce travail a été complété par l'analyse de prélèvements réalisés en différents points de trois stations d'épuration girondines. Pour évaluer la persistance virale, nous avons incubé à température ambiante et à la lumière les prélèvements de stations d'épuration positifs à l'arrivée au laboratoire. Ils ont été testés de nouveau un, quatre, vingt et cinquante cinq jours plus tard. Nous avons mis au point une méthode moléculaire quantitative de détection des entérovirus.

L'épidémiologie moléculaire des souches de norovirus circulant en Gironde a été abordée à partir des prélèvements environnementaux disponibles et des selles de 8 patients hospitalisés au CHU de Bordeaux en 1999. Nous avons identifié la présence de virus dans 8 % des échantillons testés (226 au total). Seize étaient positifs pour les entérovirus, un pour le virus de Norwalk, un pour le virus de l'hépatite A. Onze positifs provenaient de prélèvements en eau salée (11 sites) et sept de lacs (6 sites). Parmi les 18 prélèvements positifs, seulement deux étaient de mauvaise qualité bactériologique (plus de 100 CFU d'*E. coli* et/ou de streptocoques fécaux pour 100 ml d'eau). Pour ce qui concerne les stations d'épuration, deux étaient positives pour les entérovirus en différents points de prélèvements, et deux pour les norovirus.

La persistance des génomes viraux dans les prélèvements est considérable : au moins vingt jours pour les entérovirus et cinquante cinq pour les norovirus. Dans une des trois stations d'épuration, les entérovirus étaient présents en quantité importante à l'entrée de la station, et diminuait vers la sortie, sans disparaître totalement. Les norovirus identifiés correspondent à différentes souches déjà identifiées dans d'autres pays Européens.

Cette étude a confirmé la présence de gènes viraux dans les eaux de baignade de la Gironde et confirmé l'absence de corrélation avec la présence d'une contamination bactérienne. Les entérovirus sont le plus fréquemment détectés, et les souches de Norovirus identifiées sont déjà connues en Europe. La détection moléculaire de ces virus est maintenant applicable en routine. Il demeure néanmoins impossible d'affirmer si ces échantillons sont infectieux et représentent une source possible de contamination humaine. La mesure quantitative des gènes d'entérovirus pourrait permettre de contourner cette difficulté.

Publications issues de ce projet

Schvoerer E, Ventura M, Dubos O, Cazaux G, Serceau R, Gournier N, et al. Qualitative and quantitative molecular detection of enteroviruses in water from bathing areas and from a sewage treatment plant. *Res Microbiol* 2001;152(2):179-86.

Schvoerer E, Bonnet F, Dubois V, Cazaux G, Serceau R, Fleury HJ, Lafon ME. PCR detection of human enteric viruses in bathing areas, waste waters and human stools in Southwestern France. *Res Microbiol.* 2000;151(8):693-701.

Ecologie et maîtrise des légionelles et autres pathogènes opportunistes dans les réseaux d'eaux thermales

Jérôme Etienne et Yves Levi et al., 1998

Les eaux souterraines utilisées dans les établissements de soins thermaux sont l'objet de contaminations par une flore complexe ayant parfois un impact sur la santé des curistes. Ces eaux sont à faible teneur en éléments organiques nutritifs et constituent des écosystèmes particuliers, très peu étudiés jusqu'ici en ce qui concerne aussi bien le développement des bactéries, dans l'eau ou les biofilms (un assemblage supramoléculaire constitué de colonies bactériennes fixées sur un support et enfermées dans une gangue encapsulatrice) qui tapissent les parois, que leurs rapports entre elles et avec les autres micro-organismes, les amibes tout particulièrement.

Ce projet avait pour objet l'analyse des écosystèmes thermaux du point de vue de leur diversité microbienne et des spécificités du contexte nutritionnel.

Les premières études sur le biofilm ont porté sur sa croissance, notamment en fonction de la teneur en nutriments organiques de l'eau, sa composition en quantité de bactéries et de matière organique, les modifications apportées par les méthodes de nettoyage et de désinfection, la reconstitution du biofilm ensuite, et la qualité des supports.

Les résultats obtenus apportent des premiers éléments importants dans la connaissance de l'écologie de *Legionella* dans les réseaux mais ne constituent que des prémices de nos connaissances, compte tenu de la complexité des phénomènes en cause. Il a été observé que si des conditions favorables existaient, liées aux paramètres physico-chimiques de la qualité de l'eau qui alimente les canalisations, une souche de légionelles introduite pouvait coloniser un milieu de manière quasi définitive.

Les traitements simples comme des augmentations de température ou l'ajout de chlore permettent une action temporaire mais la colonisation reprend ensuite en quelques jours lorsque l'effet biocide a diminué ou disparu. Une interaction complexe existe avec des protozoaires (amibes en particulier) qui favorisent la colonisation.

La légionelle est une bactérie qui colonise tous les types de réseaux et les travaux effectués ne sont que les premiers éléments pour décrire cette écologie complexe dans laquelle intervient la qualité de l'eau, celle des matériaux, la température, l'hydraulique et les interactions entre les divers microorganismes qui échangent et partagent des éléments nutritifs et protecteurs. Si la connaissance a progressé, les travaux montrent clairement que cette écologie complexe nécessite encore de nombreux travaux pour décrire les relations entre la qualité de l'eau des réseaux, les biofilms, les protozoaires et les légionelles.

Le programme a permis d'associer des laboratoires multidisciplinaires publics et des partenaires privés dans l'objectif de comprendre la complexité du phénomène de prolifération des légionelles dans les réseaux d'eau chaude, responsables de la maladie appelée légionellose, et d'étudier les moyens de traitement. Ce groupe de recherche a créé une association appelée ECOMICTH (Ecologie microbienne en milieu thermal) qui permet d'établir des passerelles de concertation en matière de recherche entre les laboratoires publics et les structures thermales.

Comme pour les écologies complexes dans le système digestif humain ou dans l'environnement, la connaissance doit progresser et des outils nouveaux doivent être développés

Survie et maintien du pouvoir pathogène de *Salmonella* dans l'environnement aquatique anthropisé

Patrick Monfort et al., 2000

(Projet en cours)

La présence de *Salmonella* dans les eaux usées puis dans les effluents des systèmes épurateurs conduit à une contamination par ce pathogène des eaux de surface et marines. Les effets des facteurs stressants environnementaux entraînent le plus souvent la perte du pouvoir de cultiver des entérobactéries, et notamment de *Salmonella*. Les cellules bactériennes peuvent alors soit se maintenir dans les milieux aquatiques dans un état de dormance sous forme de cellules viables mais non cultivables (VNC), soit mourir et disparaître. Le maintien dans les milieux aquatiques de ces cellules VNC pose le problème de la conservation ou non de leur potentiel infectieux, et des conditions permettant ou non la reviviscence de ces cellules. Les écosystèmes aquatiques anthropisés peuvent alors devenir des réservoirs pour un tel agent pathogène non détectable par les méthodes traditionnelles bactériologiques qui pourront être à l'origine de salmonelloses dans la population humaine.

Ce projet a pour objet l'étude des conditions de survie du pathogène *Salmonella*, (dormance et reviviscence), l'adaptation cellulaire et le maintien du pouvoir pathogène. Ce travail apportera des éléments nouveaux en épidémiologie bactérienne qui contribueront à l'évaluation du risque pour la santé humaine.

Des *Salmonella* sont soumises à un ou plusieurs facteurs environnementaux dans des microcosmes contenant des eaux de surface et marines utilisées pour des activités de baignade, et des eaux saumâtres conchylicoles. L'apparition des cellules VNC est suivie par l'analyse des niveaux de viabilité cellulaire au moyen de méthodes de cytométrie permettant de suivre certaines caractéristiques biochimiques et biophysiques de la cellule. Le pouvoir pathogène des cellules VNC est testé sur un modèle cellulaire in vitro. L'expression des gènes de virulence suivie par des techniques de biologie moléculaire. Les conditions permettant la reviviscence des cellules VNC sont également explorées.

Les résultats attendus permettront d'apprécier : la relation entre le phénomène de dormance des cellules de *Salmonella* et la conservation ou non du pouvoir pathogène en lien avec des facteurs environnementaux ; les conditions permettant un retour à l'état de cellules cultivables de *Salmonella* et de développer, les outils méthodologiques permettant de rechercher des bactéries pathogènes humaines peu représentées dans les milieux aquatiques et un modèle pour l'analyse du devenir des *Salmonella typhimurium* en fonction de l'environnement aquatique

Effets sur la santé de l'exposition aux sous-produits de désinfection de l'eau

Rachel Nadif et al., 1997

La plupart des piscines sont désinfectées avec des produits contenant du chlore. Les produits de désinfection réagissent avec les cheveux, les cosmétiques, l'urine et la peau provenant des nageurs pour former des dérivés chlorés complexes et variés. Les effets de l'exposition à ces dérivés chlorés sur la santé humaine sont à l'heure actuelle encore incomplètement identifiés.

L'étude réalisée avait pour objectif de rechercher les effets de l'exposition chronique aux dérivés chlorés sur la santé de nageurs confirmés. L'évolution de paramètres biologiques et cliniques, lors d'une période d'entraînement sans exposition aux dérivés chlorés et lors d'une période d'entraînement avec exposition aux dérivés chlorés a été étudiée.

Trente six nageurs appartenant à un même club ont participé à l'étude. Ils étaient de sexe masculin, âgés de 15 à 25 ans, et s'entraînaient au moins une fois par jour. Des examens, un prélèvement salivaire et une prise de sang ont été réalisés chez les nageurs le lundi et le jeudi avant l'entraînement lors de la semaine qui suivait la vidange de l'eau de la piscine (semaine sans exposition aux dérivés chlorés car eau neuve) et plusieurs mois plus tard, lors de la semaine qui précédait la semaine de vidange de l'eau de la piscine (semaine avec exposition aux dérivés chlorés car l'eau est fréquentée pendant plusieurs mois en absence de traitement).

Une proportion élevée de symptômes d'irritation nasale, oculaire et laryngée et d'asthme a été observée. Les infections ORL étaient très fréquemment rencontrées, associées à un grand nombre de prescriptions d'antibiotiques. La muqueuse pharyngée était fréquemment inflammatoire ou infectée plus particulièrement chez les sujets n'ayant pas eu d'amygdalectomie. L'étude des réactions immunitaires dans le sang et dans la salive n'a montré aucune modification des marqueurs d'infections étudiés (nombre et répartition des globules blancs sanguins, sous-populations lymphocytaires, anticorps spécifiques dans la salive). L'effet mis en évidence était essentiellement muqueux, se traduisant par un recrutement augmenté de cellules spécialisées dans les différents sites. Ceci peut être lié à l'effort et/ou au stress engendré par un entraînement intensif, et également à un effet à long terme des conditions d'exposition sur les muqueuses.

Des modifications dans les différents paramètres biologiques étudiés ont été observées, principalement chez les nageurs s'entraînant de manière intensive (au moins 2 fois par jour) lors de la semaine d'exposition.

Enfin, des travaux réalisés dans ce bassin dans le but d'améliorer la qualité de l'eau de baignade ont eu des répercussions sur les paramètres mesurés, certaines modifications biologiques n'ayant pas été retrouvées chez les nageurs après l'installation d'un nouveau système de filtration de l'eau.

Publications issues de ce projet

Varraso R, Massin N, Héry M, Fradier-Dusch M, Michaely JP, Fournier M, Hubert G, Biette P, Rieger B, Berthelin A, Hecht G, Nadif R. Not only training but also exposure to chlorinated compounds generate a response to oxidative stimuli in swimmers. *Toxicology and Industrial Health* 2002;18(6):269-78

Identification de substances chimiques interférant avec les réponses endocrines

Jean-Claude Nicolas et al., 2000

Les perturbateurs endocriniens agissent directement, en se substituant aux hormones naturelles et peuvent avoir un impact sur le développement des organes génitaux, la fertilité, le développement de cancers hormonaux dépendants. Ces composés perturbent l'action physiologique des hormones sexuelles, en particulier les œstrogènes et les androgènes. De plus, de nombreux composés naturels présents dans l'alimentation comme les phytoestrogènes peuvent se substituer aux œstrogènes naturels.

Actuellement, de nombreuses molécules qui perturbent les réponses endocrines ont été identifiées. Elles concernent principalement les cibles des œstrogènes et des androgènes, mais il y a de plus en plus d'évidences que divers composés chimiques interfèrent également avec d'autres réponses endocrines.

L'objectif de ces travaux est de mettre au point des méthodes simples et rapides pour la détection et l'identification de molécules pouvant interférer avec les hormones naturelles (œstrogènes et androgènes).

Nous avons mis au point des méthodes qui reposent sur l'utilisation d'un modèle in vitro de cellules qui répondent à l'action de ces perturbateurs en synthétisant une enzyme, la luciférase de luciole, qui catalyse une réaction conduisant à l'émission mesurable de lumière.

Ces modèles ont permis de mettre en évidence la présence de composés actifs dans des milieux aussi différents que le sang de nouveaux nés, les eaux de station d'épuration ou les produits alimentaires.

L'étape suivante concerne la caractérisation précise de ces molécules ainsi détectées pour laquelle nous avons mis au point une méthode qui utilise les outils du génie génétique pour purifier ces substances à partir d'échantillons et analyser leur composition moléculaire par spectrométrie de masse.

Enfin pour connaître le mécanisme d'action et l'impact de ces molécules nous avons créé un modèle d'animaux qui portent des greffes de cellules rendues bioluminescentes en cas d'effet de ces molécules. Ces modèles répondent aux œstrogènes et devraient permettre d'évaluer l'accumulation dans l'animal des molécules de synthèse mais aussi d'origine naturelle (phytoestrogènes).

Publications issues de ce projet

Balaguer, P., Boussieux, A.M., Demirpence, E. and Nicolas, J.C., Reporter cell lines are useful tools for monitoring biological activity of nuclear receptor ligands, *Luminescence*, 2001; 16 (2): 153-8.

Terouanne B, Tahiri B, Georget V, Belon C, Poujol N, Avances C, et al. A stable prostatic bioluminescent cell line to investigate androgen and antiandrogen effects. *Mol Cell Endocrinol* 2000;160(1-2):39-49.

Sultan C, Balaguer P, Terouanne B, Georget V, Paris F, Jeandel C, et al. Environmental xenoestrogens, antiandrogens and disorders of male sexual differentiation. *Mol Cell Endocrinol* 2001;178(1-2):99-105.

Paris F, Balaguer P, Terouanne B, Servant N, Lacoste C, Cravedi JP, et al. Phenylphenols, biphenols, bisphenol-A and 4-tert-octylphenol exhibit alpha and beta estrogen activities and antiandrogen activity in reporter cell lines. *Mol Cell Endocrinol* 2002;193(1-2):43-9.

Paris F, Servant N, Terouanne B, Balaguer P, Nicolas JC, Sultan C. A new recombinant cell bioassay for ultrasensitive determination of serum estrogenic bioactivity in children. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87(2):791-7.

Fenet H, Gomez E, Pillon A, Rosain D, Nicolas JC, Casellas C, et al. Estrogenic activity in water and sediments of a French river: contribution of alkylphenols. *Arch Environ Contam Toxicol* 2003;44(1):1-6.

Evaluation du risque sanitaire de contamination toxoplasmique d'origine hydrique

Jean-Michel Pinon et al., 2000

(Projet en cours)

Ce programme de recherche s'inscrit dans une démarche d'évaluation du risque sanitaire toxoplasmique lié à une contamination hydrique. Pour cela il apparaît nécessaire de développer des outils encore inexistant, ce risque n'étant à l'heure actuelle qu'évoqué dans des publications récentes mais n'est pas encore clairement établi.

Afin de mieux évaluer le risque sanitaire potentiel de contamination toxoplasmique d'origine hydrique, ce travail aborde les trois points suivants :

1. L'estimation de la circulation du parasite dans l'environnement au travers de l'analyse de la prévalence toxoplasmique entre animaux herbivores (chevreuil) et omnivores (sanglier) dans un même biotope ;
2. L'efficacité des procédés usuels de désinfection (chloration) sur le pouvoir infestant des oocystes en se référant à la grande résistance des oocystes de *Cryptosporidium* et à celle des oocystes de *Toxoplasma gondii* aux agents chimiques. Le pouvoir infestant des oocystes après traitement a été testé sur modèles animaux ;
3. Le développement de techniques rapides de détection (filtration, purification des parasites et identification par bioessai chez l'animal ou par biologie moléculaire) de la forme oocyste de *Toxoplasma gondii* dans les eaux de surface, dans les rejets des stations d'épuration, et dans les eaux de consommation.

Nous avons pu montrer que :

1. Le parasite circulait sous la forme oocyste dans l'environnement ;
2. Cette forme était résistante aux traitements de potabilisation de l'eau habituellement utilisés (chlore, chloramine, dichlore) ;
3. La dose infectante en modèle in vivo était faible (1 à quelques oocystes).

Le risque potentiel de contamination d'origine hydrique existe bien et il convient donc d'améliorer la sensibilité et la rapidité des méthodes de détection.

La méthodologie développée dans notre laboratoire pourrait être proposée comme moyen simple de détection de contamination hydrique en vue de faciliter la mise en place de mesure de gestion de risque vis-à-vis de ce parasite, en visant plus particulièrement la femme enceinte non immunisée (consommation d'eaux embouteillées ou d'eau préalablement bouillie pour assurer la destruction des oocystes). Ces mêmes conseils pourraient être donnés aux patients immunodéprimés et non immunisés vis à vis du toxoplasme, qui comme pour *Cryptosporidium* (autre protozoaire dont le mode hydrique de contamination est à ce jour clairement identifié) sont la cible de ces infections opportunistes.

La contamination toxoplasmique par voie hydrique peut concerner d'une part la population humaine représentant alors un problème de santé publique mais également les élevages (bovins et ovins) pouvant entraîner des problèmes économiques.

Publications scientifiques issues de ce projet

Villena I, Aubert D, Gomis P, Ferte H, Ingland JC, Denis-Bisiaux H, et al. Evaluation of a strategy for *Toxoplasma gondii* oocyst detection in water. *Appl Environ Microbiol* 2004;70(7):4035-9.

Recherche dans les eaux hospitalières de nouvelles espèces bactériennes, éventuellement pathogènes, par co-culture d'amibes

Didier Raoult et al., 2000

L'eau du réseau hospitalier constitue un réservoir de micro-organismes responsables d'infections nosocomiales, phénomène révélé par des épisodes de contamination par des légionelles et des infections à *Mycobacterium xenopi*. L'inventaire de la flore des réseaux d'eau n'est cependant pas réalisé, en partie du fait de la position intra-amibienne (protozoaires qui leur sont associés) de certaines de ces espèces bactériennes qui rend leur isolement et leur élimination plus difficile. Ce type de bactéries peut également parasiter les macrophages humains.

Ce projet avait pour objets :

- la description de la flore bactérienne présente dans les réseaux d'eau à l'hôpital et la recherche d'anticorps dirigés contre ces bactéries chez des patients infectés
- la caractérisation de nouvelles bactéries associées aux amibes.

Durant 26 semaines ont été isolées de façon systématique, au niveau de tous les points d'eau du service de réanimation d'un hôpital, des bactéries associées aux amibes. Les bactéries isolées ont ensuite été identifiées par biologie moléculaire, puis un isolat de chaque espèce a été utilisé pour rechercher des anticorps chez les patients hospitalisés en réanimation.

310 bactéries ont ainsi été isolées, certaines espèces étaient déjà connues, *B.Bassiliensis* et *L.anisa* étant les plus représentées ; d'autres ont été caractérisées au cours de ce travail. Parmi les 13 patients chez lesquels la production d'anticorps dirigés contre des bactéries présentes dans le circuit d'eau du service de réanimation a été décelée, il a été possible d'identifier quelques temps auparavant chez deux d'entre eux l'ADN des bactéries correspondantes dans les prélèvements pulmonaires.

La présence d'anticorps était corrélée avec le développement d'une pneumonie ou d'un syndrome inflammatoire (SIRS), nous avons pu montrer également que le risque de séroconversion (production d'anticorps) était statistiquement proportionnel à la fréquence d'isolement des bactéries correspondantes dans l'eau.

En associant tests phénotypiques et étude génomique, 5 nouvelles espèces ont été identifiées. Toutes ces bactéries appartiennent aux genres *Bosea* et *Afipia* et ont en commun d'être des bactéries dont l'isolement et la culture ne peuvent être réalisés que sur un milieu de culture très spécifique ou par co-culture avec des amibes.

La caractérisation de nouvelles bactéries associées aux amibes nous a conduit à identifier et caractériser un microorganisme de la taille d'une petite bactérie associée aux amibes. Nous avons pu démontrer qu'il s'agissait en fait d'une nouvelle espèce de virus géant. Son rôle pathogène pour l'homme est en cours d'investigation.

De nouveaux tests de diagnostic sont actuellement en cours de développement pour rechercher ces micro-organismes de façon systématique

Publications issues de ce projet

La Scola B, Mallet MN, Grimont PA, Raoult D. Description of *Afipia birgiae* sp. nov. and *Afipia massiliensis* sp. nov. and recognition of *Afipia felis* genospecies A.

Int J Syst Evol Microbiol 2002;52(Pt 5):1773-82.

La Scola B, Mallet MN, Grimont PA, Raoult D. *Bosea enae* sp. nov., *Bosea massiliensis* sp. nov. and *Bosea vestrisii* sp. nov., isolated from hospital water supplies, and emendation of the genus *Bosea* (Das et al. 1996). *Int J Syst Evol Microbiol* 2003;53(Pt 1):15-20.

La Scola B, Boyadjiev I, Greub G, Khamis A, Martin C, Raoult D. Amoeba-resisting bacteria and ventilator-associated pneumonia. *Emerg Infect Dis* 2003;9(7):815-21

La Scola B, Audic S, Robert C, Jungang L, de Lamballerie X, Drancourt M, et al. A giant virus in amoebae. *Science* 2003; 299(5615):2033.

Malgré les formidables progrès acquis au cours du XX^e siècle, le risque infectieux d'origine hydrique n'a pas déserté les pays développés. Plusieurs épidémies importantes ayant parfois entraîné la mort de nombreux sujets sensibles se sont produites au cours des 15 dernières années, notamment aux Etats-Unis et au Royaume Uni.

Des études épidémiologiques récentes attribuent encore à l'eau du robinet de l'ordre de 30 % des gastro-entérites, qui surviennent principalement sur un mode endémique. Le recours à des méthodes de détection très sensibles a permis de retrouver des agents pathogènes (virus ou parasites) que les chaînes de traitement n'ont pas réussi à éliminer totalement, même en utilisant des techniques modernes et bien opérées au vu des normes actuelles de qualité microbiologique. Ces données montrent que malgré ces progrès, le dispositif de surveillance sanitaire des eaux de boisson présente encore des limites. Dans ce contexte, la démarche d'évaluation du risque, qui a connu sur le continent Nord-Américain des applications majeures pour la gestion des ressources en eau potable, pourrait utilement être introduite dans le dispositif français. Cela exige au préalable que les fonctions exposition-réponse actuellement utilisées, et issues d'expériences sur des animaux ou volontaires sains, soient validées en population générale.

Le programme de recherche E.M.I.R.A. (Epidemiology and Microbial Risk Assessment) a été mis en place afin de construire des fonctions dose-réponse pour certains virus et protozoaires pathogènes transmis par voie hydrique, dans les conditions naturelles d'exposition des individus et de survie des pathogènes dans l'environnement.

Une étude épidémiologique a été menée entre 1998 et 2000 en Isère et en Savoie. Elle a combiné un suivi des troubles digestifs dans un panel de 544 volontaires alimentés par 4 réseaux publics de distribution présentant différents degrés de vulnérabilité de leur ressource, et une surveillance microbiologique (recherche des germes tests, des virus enterovirus, rotavirus, et astrovirus, des parasites protozoaires *Giardia* et *Cryptosporidium*) de l'eau de boisson, au moyen de techniques très sensibles d'identification des germes. Deux enquêtes de consommation d'eau de boisson ont également été conduites. La relation statistique entre l'incidence des troubles digestifs et l'exposition aux pathogènes hydriques a été étudiée. Les excès de risque associés à *Giardia*, calculés respectivement par le modèle issu des données d'E.M.I.R.A et par les données expérimentales publiées dans la littérature, ont été comparés.

La fréquence moyenne de la morbidité digestive dans la population d'étude est de 7 cas sur 1000 personnes et par jour pour la morbidité digestive aiguë totale, $1,14 \times 10^{-3}$ pour les troubles objectifs et $0,50 \times 10^{-3}$ pour des gastro-entérites.

La présence de traces de matériel génétique d'astrovirus augmente d'un facteur 1,5 la fréquence de la morbidité digestive, et cette différence est significative ; pour les kystes de *Giardia*, l'augmentation est d'un facteur de 1,6 pour une unité de kyste ingéré avec 2 litres d'eau. Ainsi, sous réserve de certaines hypothèses concernant les limites des techniques de détection et la pathogénicité des kystes détectés, le modèle de fonction dose-réponse construit pour *Giardia* conforte le modèle expérimental, déjà largement utilisé, au plan international, en évaluation du risque microbiologique hydrique.

Il n'a pas été possible, en revanche, de mettre en évidence une association entre la contamination par *Cryptosporidium* ou par rotavirus et la morbidité. Les entérovirus, quant à eux, ne semblent pas être de bons indicateurs du risque viral.

Cette étude épidémiologique a permis de déterminer la fréquence des troubles digestifs aigus dans une population générale résidant en milieu rural. Elle a surtout montré que, malgré le respect des normes de qualité microbiologique de l'eau, il était possible de trouver des traces de la présence d'agents infectieux (parasites et virus) qui induisaient une morbidité digestive aiguë dans la population. Les outils de l'évaluation du risque sont utiles pour apprécier ce risque résiduel et dimensionner les mesures à mettre en œuvre.

Publications issues de ce projet

Gofti L, Zmirou D, Seigle Murandi F, Hartemann P, Potelon JL. [Waterborne microbiological risk assessment: a state of the art and perspectives]. *Rev Epidemiol Sante Pub* 1999;47(1):61-73.

Gofti-Laroche L, Gratacap-Cavallier B, Genoulaz O, Joret JC, Hartemann P, Seigneurin JM, et al. A new analytical tool to assess health risks associated with the virological quality of drinking water (EMIRA study). *Water Sci Technol* 2001;43(12):39-48.

Gofti-Laroche L, Potelon JL, Da Silva E, Zmirou D. [Description of drinking water intake in French communities (E.M.I.R.A. study)]. *Rev Epidemiol Sante Pub* 2001;49(5):411-22.

Gofti-Laroche L, Gratacap-Cavallier B, Demanse D, Genoulaz O, Seigneurin JM, Zmirou D. Are waterborne astrovirus implicated in acute digestive morbidity (E.M.I.R.A. study)? *J Clin Virol* 2003;27(1):74-82.

Gofti-Laroche L, Joret JC, Demanse D, Zmirou D. Health risks and parasitological quality of water (E.M.I.R.A. Study). *J Am Water Works Ass* 2003;95(5):162-172.

Zmirou D, Gofti-Laroche L. " Prospective studies ". In : *Drinking Water and Infectious Disease: Establishing the Links*. Ouvrage collectif, sous la direction de P Hunter et M Waite (OCDE), CRC Press. 2002



Reproduction, développement et environnement

Sylvaine Cordier
Inserm, Rennes
Présidente du Conseil scientifique du programme
de recherche Environnement & Santé

Contexte et connaissances scientifiques

De nombreux éléments de preuve rassemblés ces dernières décennies permettent d'affirmer que certaines substances chimiques, présentes sous forme de médicaments, de contaminants de l'alimentation ou lors d'expositions professionnelles ont des effets toxiques sur la reproduction humaine et le développement embryonnaire. Ces associations ont pu être établies rapidement car certains de ces effets étaient extrêmement spécifiques et l'augmentation du risque très importante. Pour de nombreuses autres substances, présentes dans l'environnement général, la mise en évidence d'effets toxiques sur la reproduction humaine est beaucoup plus complexe mais il est pourtant vraisemblable qu'un certain nombre d'entre elles contribuent à l'apparition de ces anomalies.

L'analyse des effets sur la reproduction et le développement : un problème complexe

Toutes les phases de la reproduction allant de la fécondation au développement de l'enfant peuvent être perturbées par des facteurs exogènes. La variété des modes d'action de ces différents facteurs liée aux différentes voies et fenêtres d'exposition conduit à un grand "spectre" d'effets observables. Cette complexité est augmentée par l'absence de spécificité dans les relations exposition-impacts sur la reproduction. Ainsi une mutation dans une cellule germinale (action mutagène) peut avoir pour effet une réduction de la fertilité, un avortement spontané, des cancers ou d'autres maladies dans l'enfance. À l'inverse, un avortement spontané peut résulter d'anomalies chromosomiques, de mécanismes embryotoxiques ou fœtotoxiques.

Au cours du développement embryonnaire et fœtal, les différents organes et fonctions associées se développent à des stades différents, chacun de ces stades embryonnaires présente donc des sensibilités particulières aux toxiques. C'est essentiellement au cours du premier trimestre de la grossesse que des malformations anatomiques majeures peuvent être induites (action tératogène). Les expositions intervenant plus tard dans la grossesse peuvent éventuellement induire des malformations mineures, ou des anomalies fonctionnelles et des retards de développement chez l'enfant (action embryotoxique ou fœtotoxique).

La dose du toxique (ou le niveau d'exposition) est également un paramètre important : en effet, il existe un consensus pour admettre, que hors les substances mutagènes, une substance donnée n'a pas de toxicité embryonnaire en dessous d'un certain seuil et qu'au-delà, la gravité de l'effet augmente avec la dose, pouvant aboutir à la mort de l'embryon et entraînant un avortement spontané pas toujours cliniquement décelé.

Il faut signaler, enfin, que la gravité de l'effet d'un toxique sur la reproduction ou le développement embryonnaire est souvent influencée par d'autres facteurs environnementaux et dépend du génotype de l'embryon sur lequel il agit. Ainsi, certains agents toxiques pour une espèce ne le sont pas pour d'autres, ou pas aux mêmes doses. La présence insoupçonnée de nombreuses interactions de facteurs de l'environnement, tendant à moduler l'action toxique, est en cohérence avec la forte proportion d'anomalies de la reproduction qui reste encore inexpliquée.

En résumé, la difficulté de mettre en évidence la toxicité de certains produits pour le système reproducteur chez l'homme, tient le plus souvent à l'absence de spécificité du mécanisme (un produit peut être à la fois mutagène et embryotoxique), de l'effet (suivant la période et la dose une même exposition peut aboutir à une malformation congénitale ou un avortement spontané), et aux interactions avec d'autres facteurs, génétiques ou environnementaux.

Les déterminants environnementaux des altérations de la reproduction et du développement : quelques hypothèses, trop peu de preuves

En France, une enquête réalisée en 1988-89 a montré qu'environ 14 % des couples consulteront au moins une fois pour des difficultés à concevoir. Dans la majorité des situations, un facteur féminin a été mis en cause, mais une bonne proportion des problèmes de fertilité pourrait résulter de perturbations de l'appareil reproducteur mâle.

Outre le rôle des antécédents médicaux (maladies sexuellement transmises, varicocèle, cryptorchidie), des comportements individuels (consommation de cigarettes, de cocaïne, d'alcool), des effets néfastes sur la fonction reproductrice mâle ont également été reliés à des déterminants environnementaux. Les recherches portant sur les effets délétères de contaminants de l'environnement sur la fonction reproductrice mâle se sont intensifiées au cours des dernières années, et ont permis de documenter des atteintes chez les sujets mâles de différentes espèces animales.

Une exposition à des températures élevées, aux radiations ionisantes, à des produits chimiques (plomb, certains éthers de glycol, certains pesticides comme le chlordécone et le dibromochloropropane (DBCP)) sont des facteurs de risque reconnus. Des situations professionnelles comme les postes de soudage, semblent affecter également la fonction de reproduction masculine.

Chez l'homme, la diminution de la qualité du sperme depuis les cinquante dernières années, de même que l'augmentation de l'incidence de désordres testiculaires constituent la base de l'hypothèse voulant que des composés chimiques de l'environnement, capables de mimer les effets des hormones sexuelles endogènes, soient à l'origine de désordres de la fonction reproductrice mâle.

De façon plus précise, on discute surtout à l'heure actuelle de la possibilité qu'une exposition in utero à des substances possédant des propriétés oestrogéniques puisse être à l'origine d'une grande variété d'effets adverses tels que les cancers en particulier le cancer du sein, de la prostate et des testicules (voire section C, Cancer et Environnement), l'endométriose chez la femme et dans les deux sexes des problèmes de fertilité, de malformation du système reproducteur, des modifications du comportement sexuel, des retards d'apprentissage dans la petite enfance, ainsi que des effets adverses sur le système immunitaire et la fonction thyroïdienne.

Ces effets seraient causés par des perturbations hormonales se produisant à un moment inopportun du développement intra-utérin. Cette hypothèse s'appuie en partie sur les effets néfastes qu'a engendré l'administration de diéthylstilbestrol (DES), un oestrogène de synthèse, à plusieurs millions de femmes qui présentaient des antécédents d'avortements spontanés. En théorie, un blocage de l'action des androgènes ou un stimulus oestrogénique à des moments inopportuns de la grossesse pourraient tous deux induire une altération du développement de l'appareil reproducteur mâle. Ainsi, par exemple, le principal métabolite du pesticide DDT, le o,p'-DDE, est un puissant antagoniste des androgènes chez le rat. L'o,p'-DDT et de nombreux autres composés pour lesquels des propriétés similaires ont récemment été découvertes (chlordécone, dieldrin, endosulfan, beta-hexachlorocyclohexane, p,p'-méthoxychlor, alkylphénols), pourraient perturber le développement de l'appareil reproducteur mâle, tel que le suggère l'exemple du DES. Cependant, des test in vitro et in vivo semblent indiquer que ces substances, excepté le DES, seraient beaucoup moins actives que l'oestradiol, hormone naturelle utilisée comme référence.

Le rôle de l'environnement sur l'infertilité féminine a fait l'objet de beaucoup moins de travaux, en particulier car il est très difficile d'explorer le bon déroulement des toutes premières étapes du développement embryonnaire, qui suivent la fécondation et précèdent l'implantation dans l'utérus. De même, une altération de la fonction ovarienne est difficile à mesurer. Certaines études chez des femmes professionnellement exposées ont enregistré les perturbations des cycles menstruels et de la durée des menstruations, mais la multiplicité des facteurs qui affectent ces paramètres chez la femme en font des indicateurs peu spécifiques.

Jusqu'à présent, bien que l'hypothèse soit plausible d'un point de vue biologique, il n'existe pas de preuves solides que l'exposition environnementale aux « perturbateurs endocriniens » puisse être à l'origine d'altération de la reproduction chez l'humain.

Les altérations du développement fœtal et du jeune enfant

Environ 10 à 20 % des grossesses reconnues se terminent par un avortement spontané (avant 22 semaines de gestation). 30 à 50 % des avortements spontanés sont porteurs d'une anomalie chromosomique du produit de conception (contre seulement 6 % des morts périnatales et moins de 1 % des naissances). Les morts fœtales tardives (supérieur à 22 semaines), les morts nés et les morts néonatales précoces avant le 8^{ème} jour sont comptabilisés dans la mortalité périnatale. En France en 1991, elle était de 8,2 pour 1000 naissances. La prématurité est définie comme un accouchement survenant avant 37 semaines révolues d'aménorrhée. En France, en 1998, le taux de prématurité a été estimé à 6,2 % des naissances. Le retard de croissance intra-utérin est défini par un poids à la naissance inférieur à une valeur seuil dépendant de l'âge gestationnel et du sexe du nouveau-né et le plus souvent, ce seuil correspond au dixième ou cinquième percentile de la distribution des poids de naissance de la population générale, il atteint environ 6 % des naissances. Les malformations congénitales majeures affectent environ 1 à 2 % des naissances.

Historiquement, les facteurs de risque de malformations congénitales ont été surveillés depuis longtemps, surtout pour identifier les effets secondaires des médicaments pris pendant la grossesse. Ceci a pu se faire grâce à la mise en place de registres de malformations dans le monde, suite à la mise en évidence des effets tératogènes massifs de la thalidomide, médicament antinauséeux prescrit pendant la grossesse dès les années 1950. Une estimation des risques attribuables à différentes causes de malformations faite en 1983 n'identifiait des causes environnementales probables que pour une faible partie d'entre elles (environ 2-3 %). Parmi les autres causes, figurent les infections maternelles, les maladies métaboliques de la mère, les médicaments les facteurs génétiques et les interactions gènes-environnement. Aujourd'hui, on considère encore qu'environ 60 % des malformations congénitales n'ont pas de cause identifiée.

Les premières associations entre facteurs d'environnement et malformations congénitales ont été observées lors d'expositions exceptionnelles. A Hiroshima et Nagasaki, les survivants exposés in utero aux radiations présentaient des signes de microcéphalie et de retard mental. A Minamata, au Japon à nouveau, la consommation, par les mères, de poisson contaminé par le méthylmercure a produit des syndromes neurologiques graves chez les enfants. A Yusho enfin et Yucheng (Taïwan), l'ingestion d'huile contaminée par des polychlorobiphényles (PCBs) pendant la grossesse, a provoqué l'apparition d'hyperpigmentation chez les nouveau-nés, puis de retards du développement neurocomportemental chez les enfants.

Depuis, en complément des systèmes de surveillance, un grand nombre d'études épidémiologiques ont permis d'identifier des produits potentiellement associés, voire certainement, à des anomalies du développement comme les avortements spontanés, les malformations congénitales ou les retards de développement neurocomportemental de l'enfant, lors d'une exposition maternelle. Les radiations ionisantes, le mercure, le plomb, les PCBs et dioxines, certains solvants et pesticides, certains gaz anesthésiants sont concernés par ces associations. Ces mêmes substances ont également été associées à un excès de risque d'avortements spontanés lors d'expositions paternelles mais la relation est moins fermement établie.

Le développement du système nerveux central est un processus particulièrement sensible aux expositions toxiques survenant in utero et dans l'enfance compte-tenu de sa durée de développement beaucoup plus longue que celle des autres systèmes. L'évaluation de ses atteintes est complexe car elle doit faire appel à des tests neurologiques, psychométriques ou neurophysiologiques. L'influence possible de facteurs de l'environnement a récemment été évoquée pour expliquer l'augmentation de l'incidence de pathologies telles que l'autisme ou le syndrome d'hyperactivité et déficit d'attention (Attention Deficit Hyperactivity Disorder, ADHD).

Concernant la prématurité ou le retard de croissance intra-utérin, il n'y a pas d'évidence forte du rôle étiologique d'une exposition professionnelle ou environnementale à des substances chimiques ou agents physiques. Seule l'exposition au plomb semble augmenter le risque de retard de croissance intra-utérin; ce risque a été identifié pour l'exposition maternelle au travers de plusieurs études, il a également été rapporté un cas d'exposition paternelle. Par ailleurs, la littérature récente sur les toxiques chimiques de l'environnement évoque une augmentation de la fréquence de retard de croissance intra-utérin dans des populations exposées notamment aux trihalométhanes –sous-produits de chloration de l'eau– ou à certains herbicides ou résidus d'insecticides type DDT, à la pollution de l'air, observations qui doivent être confirmées.

Les difficultés à conduire des études épidémiologiques dans ce champ sont telles que, alors que chez l'animal plusieurs milliers de produits ont été identifiés comme toxiques pour la reproduction, seuls quelques dizaines (incluant les médicaments) sont des produits toxiques confirmés pour la reproduction humaine. Pourtant parmi les tératogènes connus, les doses seuil traduisent une plus grande sensibilité de l'homme à ces substances (de l'ordre d'un facteur 10, jusqu'à 100 pour les PCBs).

Références bibliographiques

Cordier S, Ayotte P, De Wals P, Ducot B, Dodin S, Saurel-Cubizolles MJ and Thoneau P.(2003). Reproduction. In: Gérin M, Gosselin, P, Cordier, S, Viau, C., Quénel, P, and Dewailly, E., editor. Environnement et santé publique. Fondements et pratiques. Montréal, Paris: edisem inc., Tec & Doc, p. 641-667.

Présentation des projets

Entre 1996 et 2000, sur les quinze projets relevant du champ de la reproduction et du développement, neuf d'entre eux ont porté sur le mode d'action et les effets de produits soupçonnés d'agir comme perturbateurs endocriniens, trois se sont intéressés aux conséquences d'expositions in utero sur le développement neurocomportemental des enfants, trois autres enfin ont étudié les effets reprotoxiques du plomb, ou des solvants en particulier les éthers de glycol.

● Impact et modes d'actions de perturbateurs endocriniens

Le nonylphénol est un composant de l'industrie des matières plastiques et de la fabrication des détergents ; son utilisation fréquente et sa grande stabilité ont pour conséquence une contamination des cours d'eau et des risques de bioaccumulation le long de la chaîne alimentaire. Il apparaît cependant que chez les mammifères, ce contaminant est rapidement absorbé et éliminé grâce à des systèmes métaboliques efficaces. Une bioaccumulation dans les tissus est donc peu probable, limitant ainsi la dangerosité de ce produit (Cravedi et al., 1999). On a pu montrer aussi que le pouvoir de perturbation endocrinienne (oestrogénomimétique ou «estrogen-like»), et les niveaux d'exposition pour le

consommateur des phtalates et du bisphénol A, constituants des emballages alimentaires, sont nettement inférieurs à ceux de certains produits naturels présents dans notre alimentation comme les phyto-oestrogènes (Lhuguenot JC et al., 2000). Il apparaît également que la protéine de liaison humaine des stéroïdes sexuels SHBG (Sex-Hormone-Binding Globulin) limite la diffusion du bisphénol A vers des organes cibles notamment le foie et les testicules (Pugeat et al., 1997).

L'impact des perturbateurs endocriniens a été étudié dans différents systèmes expérimentaux. De fortes concentrations de trois pesticides utilisés pour certains jusqu'à une date récente dans certaines régions françaises (lindane, méthoxychlore et dieldrine) altèrent la maturation des ovocytes (ovules) et la fécondation de certaines espèces d'invertébrés marins et de la souris, suggérant un impact possible de ces produits sur l'écosystème marin et potentiellement chez l'homme lors de circonstances d'expositions exceptionnelles (Ciapa B et al., 1997).

Outre ses effets sur le développement neurologique de l'enfant, le plomb est soupçonné d'avoir d'autres cibles dans le système reproducteur. Des expériences réalisées chez la souris et dans des cellules humaines in vitro ont montré une atteinte de la fonction ovarienne pouvant avoir pour conséquence une hypofertilité chez la femme par un mécanisme de perturbation hormonale (Machelon V et al., 1999).

Le développement testiculaire pendant la gestation est une des cibles potentielles des perturbateurs endocriniens. Un système de culture de cellules testiculaires a permis d'identifier le mécanisme d'action du bisphénol A, plus particulièrement sur les gonocytes, en même temps qu'était testé sur ce modèle l'impact de substances à activité oestrogénique puissante comme l'oestradiol et un médicament, le diethylstilbestrol (Jégou Bet al., 1998). Ces résultats obtenus in vitro n'ont cependant pas été confirmés in vivo lors de l'exposition de la souris en cours de gestation à des concentrations de ce même bisphénol A couramment rencontrées dans les populations humaines (Le Magueresse-Battistoni B et al., 2000). Dans cette expérience, un passage transplacentaire a été mis en évidence mais aucun effet sur le développement testiculaire n'a été décelé. Par ailleurs, le bisphénol A et l'atrazine (herbicide utilisé en grandes quantités dans le monde) présents dans l'eau de boisson à des concentrations comprises entre 1mM et 10 mM induisent in vivo chez le rat des perturbations du processus de formation osseuse au cours du développement embryonnaire. Ces données confirment les résultats obtenus in vitro sur les cellules osseuses (ostéoblastes et ostéoclastes) isolées à partir d'os de rats nouveau-nés femelle ou mâle mettant en jeu les récepteurs des oestrogènes ou ceux des androgènes suivant le sexe de l'animal. Cependant, ces molécules n'ont aucun effet sur les cellules osseuses provenant de rat au sevrage ou adulte (Lieberherr M et al., 2000). Ces résultats confirment que l'évaluation du risque pour l'homme exige la confrontation de différentes méthodologies expérimentales.

Les conséquences de l'utilisation agricole intensive de pesticides depuis des décennies en culture tropicale ont été évaluées en Guadeloupe sur la fonction de reproduction de mammifères sauvages. Les animaux capturés dans les bananeraies (où les pesticides ont surtout été utilisés) ont des organes génitaux plus petits et des taux de testostérone plus faibles que ceux d'animaux de même âge capturés sur la côte, mettant ainsi en évidence un effet probable de cet environnement sur la fonction de reproduction mâle (Multigner L et al., 1999).

Actuellement, peu d'études ont été réalisées sur les conséquences possibles de la perturbation endocrinienne dans les populations humaines. Une étude française, intégrée dans un réseau Européen, a confirmé l'existence de variations géographiques de la qualité du sperme dans différentes régions françaises et européennes ainsi que le déclin de la qualité spermatique dans ces mêmes régions au cours des dernières décennies (Jouannet A et al., 1996).

Effets sur le développement neuro comportemental de l'enfant

Bien que les effets sur le développement neurocomportemental de l'enfant de substances comme le plomb, le mercure ou les polychlorobiphényles (PCBs) soient connus depuis longtemps, des incertitudes subsistent quant aux doses auxquelles elles agissent ainsi que sur leur mécanisme d'action. La mise en évidence de gènes exprimés lors de l'exposition aux PCBs pourrait permettre de disposer d'un modèle prédictif de la neurotoxicité de ces substances. Des travaux de ce type ont été entrepris avec pour objectif d'examiner la possibilité d'identifier des indicateurs biologiques de niveau d'exposition aux PCBs (Francon J, 1999). Plusieurs gènes, dont l'expression est modulée par les PCBs ont été identifiés. Cependant, les variations observées ne permettent pas actuellement d'étudier l'effet dose-réponse des PCBs et d'envisager leur utilisation en tant que marqueur d'exposition.

Au cours d'un suivi de près de 20 ans d'une cohorte d'enfants dont l'exposition in utero au plomb a pu être quantifiée, des associations inverses ont été observées à 6 ans avec les performances sur des tests de cognition, de mémoire et verbaux et à un moindre degré les performances motrices et perceptives. A l'adolescence (17-18 ans), des altérations de performances cognitives ou motrices ne sont plus perceptibles suggérant une réversibilité des effets antérieurs. La mémoire par contre continue d'être affectée à l'adolescence (Huel G et al., 1996).

Les activités d'orpaillage ont entraîné depuis des décennies une contamination de l'environnement et de la chaîne alimentaire par le méthylmercure en Guyane. Les populations grosses consommatrices de poissons, en particulier les

populations amérindiennes dont c'est la principale source de protéines, sont particulièrement vulnérables et, comme cela avait déjà été suggéré en Amazonie Brésilienne, on a pu constater que les niveaux d'exposition auxquelles elles sont soumises entraînent de légers déficits de performances sur la motricité et l'organisation visuospatiale chez les enfants (Cordier S et al., 1996).

Autres effets sur la reproduction

Les éthers de glycol sont une classe de solvants dont l'usage s'est développé depuis les années 1970. Certains d'entre eux parmi les plus utilisés à cette époque, ont des effets démontrés chez l'animal en particulier sur la fertilité et l'embryogenèse. La question se pose donc d'évaluer l'impact du contact avec ces produits dans les populations professionnellement exposées. Une étude réalisée chez les employés de la Ville de Paris n'a pas permis de mettre en évidence d'association entre l'exposition actuelle aux éthers de glycol (telle que validée par des biomarqueurs urinaires), les caractéristiques du sperme et les niveaux d'hormones. Par contre l'estimation des expositions passées aux éthers de glycol semble associée à un déficit de certains paramètres (concentration du sperme...), ces observations pouvant résulter de l'utilisation dans le passé de produits de la même famille, beaucoup plus toxiques pour la reproduction (Multigner L et al., 1996).

Le risque de malformations congénitales (fentes labiales ou palatines) liées à l'utilisation professionnelle de ces solvants pendant la grossesse a également été évalué. Cette étude confirme une association avec l'exposition aux solvants type éthers de glycol, mais l'existence de co-expositions à d'autres polluants, en particulier à d'autres solvants, rend l'établissement de la causalité difficile. La mise en évidence de susceptibilités génétiques grâce à l'étude des polymorphismes de gènes important pour le métabolisme (alcool-déshydrogénase, CYP450) ou intervenant dans la détoxification (glutathion-s-transférase) de ces substances devrait permettre de définir des sous-groupes à risque et les mécanismes d'action de ces produits (Cordier S et al., 1998).

Synthèse & perspectives

L'étude de l'impact de l'environnement sur la reproduction au sens large (intégrant le développement intra utérin) est encore un champ de recherches en émergence. Il est particulièrement complexe car trois individus, recevant des expositions différentes et porteurs de susceptibilité propre à chacun, sont en jeu : la mère, le père et l'enfant en devenir. Un autre élément contribue à cette complexité, les relations dose-effet, qui conduisent en général à observer que la fréquence d'une atteinte augmente avec la dose de l'exposition à un toxique, sont ici souvent non linéaires. Ceci est dû à l'existence de périodes de vulnérabilité variables, à l'action probable et simultanée de mécanismes biologiques encore trop mal connus comme ceux induit par les perturbations endocriniennes. Ces caractéristiques rendent l'identification de produits dangereux particulièrement difficile.

Ce champ de recherches a reçu jusqu'à présent un soutien limité des pouvoirs publics tant il est vrai que les travaux visant à l'amélioration de la prise en charge médicale de la grossesse et du nouveau-né ont supprimé des facteurs de risque majeurs d'issues de grossesse défavorables et que le développement des techniques de fécondation artificielle a contribué à rendre plus acceptables les difficultés de procréation pour la population.

Concernant les besoins de connaissances on peut identifier un certains nombres de priorités :

- l'identification précoce des substances potentiellement «reprotoxiques» lors de leur mise sur le marché.
- le développement in vitro de marqueurs biologiques signant des mécanismes d'action nouveaux comme celui de la perturbation endocrinienne ou celui d'une atteinte des cellules germinales. A moyen terme l'utilisation de ces marqueurs pour l'homme serait souhaitable,
- le développement de tests multigénérationnels permettant de mesurer l'impact d'agent mutagènes ou tératogènes sur plusieurs générations.
- le renforcement des connaissances sur les autres facteurs, exogènes ou individuels, favorisant ou atténuant les effets reprotoxiques. Il est vraisemblable en effet que les facteurs génétiques jouent un rôle prépondérant dans ce domaine.
- le développement de méthodologies visant à améliorer la précision des mesures d'exposition individuelle aux contaminants de l'environnement dans les études épidémiologiques, prise en compte des périodes clés du développement. Les quelques études épidémiologiques récentes qui se sont donné les moyens d'intégrer des mesures d'exposition précises sur la contamination des eaux (sous-produits de la chloration par exemple), de l'air (HPA), des aliments (mercure, pesticides) ou de certaines expositions professionnelles ont pu mettre en évidence des atteintes précédemment insoupçonnées. Ces études restent encore rares et n'ont certainement pas encore permis d'évaluer l'ampleur du risque pour la santé publique et encore moins de produire des outils d'aide à la prévention.

Les équipes françaises mobilisées autour de ce thème sont encore peu nombreuses et contribuent insuffisamment à la production de connaissances nécessaires à l'expertise dans ce domaine, malgré des situations d'expositions environnementales préoccupantes en France (incinération, trafic routier, pollutions agricoles, etc.).

Les sources de financement dans ce domaine sont extrêmement limitées et le programme Environnement & Santé a contribué de façon déterminante aux travaux qui ont pu être réalisés en France. Les effets des pollutions environnementales actuellement redoutés, qu'ils concernent par exemple une détérioration de la qualité des cellules germinales ou des retards de développement intellectuel chez l'enfant, portent potentiellement atteinte à la qualité des espèces et à l'espèce humaine en particulier justifiant une intensification des travaux de recherche dans ce domaine, tant pour l'identification des agents toxiques que pour l'évaluation de l'efficacité des mesures de réduction des expositions.

Résumés des projets

Qualité du sperme, fonction de reproduction et fertilité chez l'homme, facteurs de variation et environnement

Jacques Auger et P. Jouannet et al., 1996

La responsabilité de facteurs environnementaux est régulièrement suggérée pour expliquer l'augmentation progressive et les variations géographiques des altérations de la fonction de reproduction. La plupart des conclusions sont formulées à partir d'analyse rétrospective de données acquises dans des contextes et des méthodologies variables.

L'objectif principal de cette étude était de définir les conditions selon lesquelles pouvaient être recrutés des hommes fertiles afin d'étudier l'influence des facteurs environnementaux sur la fonction de reproduction :

- mise en place d'un recrutement de volontaires partenaires de femmes enceintes à partir des consultations prénatales d'un hôpital parisien. Ces hommes devaient d'une part remplir un questionnaire (relatif aux antécédents médicochirurgicaux, aux conditions de vie et de travail, aux conditions d'obtention de grossesse) et d'autre part accepter un examen clinique des dosages hormonaux et un examen de sperme ;
- étude de faisabilité de recrutement d'hommes fertiles dans 6 CECOS (Centre d'Etude et de Conservation des Œufs et du Sperme humains), répartis sur l'ensemble du territoire, pour la mise en place d'un protocole multicentrique beaucoup plus vaste ;
- analyses de données collectées par les CECOS depuis 1973 pour discuter les variations séculaires et géographiques de la qualité du sperme humain en France ;
- standardisation et mise au point d'un contrôle de qualité des méthodes d'analyse du sperme, évaluation de nouvelles méthodes de mesures objectives des paramètres spermatiques utiles pour les études épidémiologiques.

Cette étude a montré qu'il était possible de recruter des hommes partenaires de femmes enceintes sans proposer d'indemnité, il est cependant indispensable de s'appuyer pour ce recrutement sur des personnes spécifiquement formées à la communication et à la formation. Le bilan de recrutement dans les CECOS a en revanche été négatif et aurait nécessité de confier cette tâche à une personne spécifiquement formée.

Les résultats de l'étude rétrospective confirment l'existence d'une très probable baisse de la qualité du sperme principalement liée à l'année de naissance. Une différence significative de la qualité du sperme d'homme fécond a été par ailleurs observée dans différentes villes françaises.

Des données de référence sur la qualité du sperme et le délai à concevoir (DNC) d'une population assez homogène d'hommes féconds ont pu être obtenues. Par contre, la taille de la population d'hommes recrutés à Paris n'a pas permis une analyse précise des relations entre caractéristique spermatiques, DNC et les facteurs environnementaux et de mode de vie collectés par questionnaire. Cependant, grâce à un protocole similaire mené conjointement au niveau européen, ce travail fait état de différences géographiques de la qualité du sperme et du DNC.

Ce projet a conduit au développement d'une méthode de mesure de la concentration spermatique, dont les avantages sur les méthodes classiques ont été démontrés.

Publications issues de ce projet

Auger J, Jouannet P. Evidence for regional differences of semen quality among fertile French men. Federation Francaise des Centres d'Etude et de Conservation des Oeufs et du Sperme humains. Hum Reprod 1997;12(4):740-5.

Auger J, Eustache F, Ducot B, Blandin T, Daudin M, Diaz I, et al. Intra- and inter-individual variability in human sperm concentration, motility and vitality assessment during a workshop involving ten laboratories. Hum Reprod 2000;15(11):2360-8.

Auger J, Eustache F, Andersen AG, Irvine DS, Jorgensen N, Skakkebaek NE, et al. Sperm morphological defects related to environment, lifestyle and medical history of 1001 male partners of pregnant women from four European cities. *Hum Reprod* 2001;16(12):2710-7.

Eustache F, Jouannet P, Auger J. Evaluation of flow cytometric methods to measure human sperm concentration. *J Androl* 2001;22(4):558-67.

Jensen TK, Slama R, Ducot B, Suominen J, Cawood EH, Andersen AG, et al. Regional differences in waiting time to pregnancy among fertile couples from four European cities. *Hum Reprod* 2001;16(12):2697-704.

Jorgensen N, Andersen AG, Eustache F, Irvine DS, Suominen J, Petersen JH, et al. Regional differences in semen quality in Europe. *Hum Reprod* 2001;16(5):1012-9.

Slama R, Eustache F, Ducot B, Jensen TK, Jorgensen N, Horte A, et al. Time to pregnancy and semen parameters: a cross-sectional study among fertile couples from four European cities. *Hum Reprod* 2002;17(2):503-15.

Impact des contaminants des eaux de boissons et de surface sur la maturation et la fécondation des ovocytes

Brigitte Ciapa et al., 1997

Ce projet avait pour objet l'étude de l'impact des pesticides sur la maturation et la fécondation des ovocytes de trois espèces animales différentes : deux invertébrés marins (l'oursin et l'étoile de mer) et un mammifère (la souris). En effet, certains de ces composés sont dits "oestrogéniques" car ils peuvent se comporter comme des xéno-oestrogènes, et mimer l'action d'une des principales hormones femelles, l'oestradiol. Le choix des pesticides testés était guidé par des résultats d'analyse effectuées par la DDASS du Finistère dans les années 1990 qui ont mis en évidence la présence du lindane, largement utilisé en agriculture, du méthoxychlor (ou MXC, un dichlorodiphényléthane) et de la dieldrine (un cyclodiène) dans les eaux courantes.

L'analyse de la vitesse de dégradation et d'élimination de ces composés dans l'environnement ou dans les organismes a mis en évidence une bio-accumulation de ces molécules. Leurs effets peuvent donc être persistants et l'exposition à long terme, même à de faibles doses, peut conduire à leur accumulation dans certains tissus animaux.

En particulier, des quantités non négligeables de certains pesticides peuvent s'accumuler dans le tissu ovarien, les embryons et fœtus humains. Lindane, dieldrine et MXC ont ainsi pu être détectés dans les ovaires, les liquides folliculaires et les tissus utérins.

La maturation est une étape nécessaire dépendante de l'action d'hormones, dont l'oestradiol, et conduit à la formation d'ovocytes capables d'être fécondés. Cette étude suggère que les trois composés sont capables d'altérer la maturation des ovocytes chez l'étoile de mer comme chez la souris. Une altération de la fécondation a également été montrée, chez l'oursin ou l'étoile de mer. L'activation (reprise du cycle de méiose qui fait normalement suite à la fécondation) spontanée intervient pour un pourcentage élevé d'ovocytes de souris traités avec ces pesticides.

La contamination de l'eau de mer par les pesticides peut donc affecter différents stades du développement embryonnaire. Les effets observés ont été obtenus à de fortes concentrations de pesticides. Cependant, il reste possible que les organismes tels que l'oursin, capable de filtrer de grandes quantités d'eau, accumulent des doses non négligeables de ces produits dans certains tissus. Enfin, l'homme pourrait être en contact avec des fortes concentrations de ces pesticides en cas d'incidents majeurs, dans des zones polluées où ces produits ne sont pas manipulés avec toutes les précautions nécessaires, en particulier dans les pays en voie de développement.

Publications issues de ce projet

Picard A, Palavan G, Robert S, Pesando D, Ciapa B. Effect of organochlorine pesticides on maturation of starfish and mouse oocytes. *Toxicol Sci* 2003;73(1):141-8.

Pesando D, Robert S, Huitorel P, Gutknecht E, Pereira L, Girard JP, et al. Effects of methoxychlor, dieldrin and lindane on sea urchin fertilization and early development. *Aquat Toxicol* 2004;66(3):225-39.

Risques neurotoxiques chez l'enfant liés à l'exposition au méthylmercure en Guyane Française

Sylvaine Cordier et al., 1996

La neurotoxicité du méthylmercure est connue depuis la catastrophe de Minamata au Japon dans les années 1950, où plusieurs centaines de personnes ont été atteintes de désordres neurologiques graves souvent irréversibles, suite à la consommation régulière de poisson contaminé par du méthylmercure. Des enfants ayant de sévères atteintes neurologiques sont nés de mères ne montrant pratiquement aucun symptôme. Une autre épidémie en Irak en 1971-1972, due à l'ingestion de farines contaminées, a permis de mieux quantifier la relation entre l'exposition et les atteintes observées. On admet généralement que des expositions résultant en des concentrations maternelles dans le cheveu de l'ordre de 10-20 g/g sont susceptibles d'accroître le risque d'atteinte cérébrale chez le fœtus, provoquant des perturbations du développement moteur telles qu'un retard d'apprentissage de la marche. Plus récemment, des études ont recherché des effets plus fins en mesurant le développement neurocomportemental de l'enfant à l'aide de tests psychologiques ou de motricité, à différents âges, en relation avec une exposition prénatale au méthylmercure, aux Seychelles ou en Nouvelle-Zélande, dans des populations consommatrices régulières de poisson. Les observations publiées récemment sur une cohorte d'enfants des Iles Féroé semblent indiquer des effets neuropsychologiques à des niveaux d'exposition inférieurs à 10 g/g dans le cheveu maternel.

Notre étude a été initiée dans le cadre d'un programme visant à évaluer les conséquences environnementales et sanitaires de la pollution par le mercure en Guyane Française liée aux activités d'orpillage, plus particulièrement dans les villages amérindiens du Haut-Maroni où l'exposition des populations est la plus forte.

Un examen neurologique et neuropsychologique des enfants a été conduit entre 1997 et 1998 dans trois communautés amérindiennes de Guyane : le Haut Maroni (Cayodé, Elahé, Twenke, Taluhen et Antecume-Pata), Camopi et Awala. Les niveaux individuels d'exposition au méthylmercure ont été mesurés par détermination du mercure total dans les cheveux des enfants et de leurs mères. Un questionnaire standardisé rempli avec la mère a permis d'évaluer les paramètres sociodémographiques et médicaux. L'examen neurologique a été réalisé par trois médecins et neuropédiatres sur les enfants âgés de 9 mois à 6 ans (97 enfants dans le Haut Maroni, 69 à Camopi et 82 à Awala de même âge et sexe). Des relations ont été mises en évidence entre l'exposition au mercure et la présence de réflexes ostéotendineux accrus et une moins bonne coordination des jambes. L'examen neuropsychologique conduit par trois psychologues a porté sur les enfants de 5 à 12 ans (103 enfants dans le Haut-Maroni et 103 à Awala de même âge et même sexe). Il a mis en évidence une association entre le niveau d'exposition au mercure et un déficit de performance dans les tests mesurant en particulier les capacités d'organisation visuospatiale. Ce déficit est plus marqué chez les garçons. La prise en compte des caractéristiques médicales, sociodémographiques ou les habitudes de vie ne modifie pas les relations observées.

En conclusion, il n'a pas été observé de déficiences majeures en relation avec l'exposition au mercure, mais les signes mis en évidence confirment le rôle toxique probable du méthylmercure sur les fonctions neurologiques et intellectuelles dans ces populations. Ils sont en accord avec d'autres études en cours sur des populations semblables dans le monde. Ils soulignent la nécessité de mettre en place rapidement des mesures visant à réduire l'exposition de ces populations au mercure.

Publications issues de ce projet

Cordier S, Garel M, Mandereau L, Morcel H, Doineau P, Gosme-Seguret S, Josse D, White R, Amiel-Tison C. Neurodevelopmental investigations among methylmercury-exposed children in French Guiana. *Environ. Res.* 2002; 89 (1): 1-11

Exposition maternelle aux solvants, susceptibilité génétique et risque de fente orale

Sylvaine Cordier et al., 1998

La prévalence des malformations congénitales à la naissance est de l'ordre de 2 pour 100 naissances. Avec la réduction de la fréquence des pathologies infectieuses néonatales et de la prématurité, elles sont devenues, dans les pays occidentaux, une source majeure de mortalité et de morbidité néonatales et infantiles. Leur étiologie est complexe et le plus souvent sous la double dépendance de facteurs génétiques et environnementaux. Parmi les malformations congénitales, les fentes labiales et palatines (environ 1 pour 700 naissances) semblent particulièrement sensibles aux expositions environnementales sans que des facteurs étiologiques aient été identifiés avec certitude. Parmi ceux-ci, ont été évoqués la consommation de tabac maternel pendant la grossesse, la consommation d'alcool et les apports en vitamines.

Lors d'une étude précédente, nous avons mis en évidence le rôle possible de l'exposition professionnelle maternelle aux solvants pendant la grossesse dans la survenue de malformations congénitales. Pour confirmer cette association, nous avons comparé des familles d'enfants atteints de bec de lièvre et traités par chirurgie maxillo-faciale dans des

hôpitaux de Lyon, Paris, Clermont-Ferrand et Grenoble, à des familles d'enfants témoins. A l'occasion d'un entretien avec la mère, des questions ont porté sur le déroulement de la grossesse, l'alimentation, les expositions professionnelles et l'environnement dans lequel vit la famille. Des prélèvements de sang de l'enfant et de ses parents ont permis de caractériser les systèmes enzymatiques, variables d'une personne à l'autre, qui peuvent modifier les réactions de l'individu à son environnement. Ces variations ont été examinées en regard des malformations congénitales observées.

Nos résultats confirment des augmentations de risque de bec de lièvre, en relation avec la consommation de tabac et la consommation d'alcool au 1er trimestre de la grossesse. Parmi les professions occupées par les mères de cas et de témoins au 1er trimestre de la grossesse, les ouvrières sont nettement plus représentées chez les mères de cas que de témoins, en particulier les couturières et les préposées à l'emballage.

Les risques relatifs associés à l'exposition à différentes classes de solvants (oxygénés, chlorés, pétroliers) sont en général supérieurs à 1, surtout pour la classe des solvants chlorés. Parmi les autres produits on trouve en excès les composés du plomb et les expositions aux rayonnements électromagnétiques de «extrêmement basse fréquence». L'exposition aux éthers de glycol montre des relations dose-effet avec le risque de becs de lièvre, relations qui vont dans le même sens que nos résultats précédents.

La caractérisation de la susceptibilité génétique individuelle des enfants et de leurs parents à la recherche d'interactions gènes-environnement est actuellement encore en cours. Les premières analyses des facteurs génétiques ont porté sur le gène ADH3 (alcool déshydrogénase) qui métabolise les alcools. Elles mettent en évidence un certain degré de protection vis à vis du risque de bec de lièvre, chez les enfants porteurs d'une certaine forme du gène ADH3 (génotype). Malgré le rôle probable de l'ADH3 dans la métabolisation des alcools, le caractère protecteur d'un fond génétique donné (ici représenté par les formes variables du gène ADH3) semble s'exprimer indépendamment de l'exposition maternelle à l'alcool ou aux éthers de glycol. En d'autres termes, il n'y aurait pas d'interaction gène-environnement entre ce génotype et l'exposition aux alcools. Ainsi, l'expression des formes variables du gène ADH3 ne dépendrait pas d'une exposition à un environnement particulier. Les analyses génétiques ne sont pas terminées et un bon nombre d'hypothèses génétiques et d'interactions gène-environnement restent à explorer à partir de cette étude.

Publications issues de ce projet

Chevrier C, Perret C, Bahau M, Nelva A, Herman C, Francannet C, Robert Gnansia E, Cordier S. Interaction between the ADH1C polymorphism and maternal alcohol intake in the risk of nonsyndromic oral clefts : An evaluation of the contribution of child and maternal genotypes. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2004 Dec 15

Métabolisme chez le rat et chez l'homme d'un xénoestrogène : le nonylphénol

Jean-Pierre Cravedi et al., 1997

Certains contaminants d'origine industrielle présentent des propriétés hormonales. Il peut s'agir de propriétés estrogéniques (semblables à celles des hormones femelles) ou anti-androgéniques (empêchant l'action d'hormones mâles). Ces substances, appelées xéno-estrogènes, sont susceptibles d'agir sur le système endocrinien des animaux et de l'Homme. Parmi elles, le nonylphénol est utilisé dans l'industrie des matières plastiques et dans la fabrication de détergents. Son utilisation fréquente et sa stabilité ont pour conséquence une contamination des cours d'eau et des risques de bioaccumulation dans la chaîne trophique. Il est présent en grandes quantités dans les boues de stations d'épuration. Au cours des 8 dernières années, les propriétés estrogéniques du nonylphénol ont été décrites in vitro et in vivo chez les poissons et les mammifères.

Ces propriétés chimiques et biologiques peuvent faire craindre que le nonylphénol présente un risque pour la santé de l'homme en perturbant son équilibre hormonal. Parmi les questions posées au démarrage de l'étude, certaines concernaient le mode d'action de ce type de substance et d'autres avaient pour objet son devenir dans l'organisme. C'est essentiellement à ce second volet que nous nous sommes intéressés en cherchant à apporter des éléments de réponses à ces différentes questions :

- Dans quelle mesure le nonylphénol peut-il être absorbé lorsqu'il est ingéré ?
- Quels sont les tissus susceptibles d'être prioritairement contaminés ?
- Est-ce que les mammifères, dont l'homme, sont capables d'éliminer le nonylphénol ?
 - Cette élimination est-elle rapide ?
 - Nécessite-t-elle une transformation préalable de la substance ?
 - Si une transformation avait lieu, pourrait-elle entraîner la formation de composés encore plus actifs que le produit d'origine ?

- Ces processus sont-ils différents chez les mâles et les femelles ?
- Le devenir du nonylphénol dépend-il de la dose ?
- L'homme possède-t-il les mêmes mécanismes de défense que le rat vis-à-vis de ce composé ?

Grâce à des travaux faisant intervenir des molécules radioactives de nonylphénol, et mettant en œuvre des expérimentations sur le rat et sur des cellules hépatiques humaines, nous avons pu montrer que ce contaminant était rapidement absorbé et éliminé. Peu de résidus restent présents dans les tissus après la contamination. Cette élimination est essentiellement due à des mécanismes de transformation (métabolisation) efficaces qui ont lieu dans le foie. C'est du reste dans cet organe que les concentrations en nonylphénol sont les plus importantes, après le tube digestif. Les mêmes voies de métabolisation sont utilisées par le rat et l'homme pour éliminer le nonylphénol, que l'on retrouve en grande partie dans l'urine sous forme de produits transformés.

Les produits de transformation ont totalement ou partiellement perdu les propriétés estrogéniques du nonylphénol. Ces mécanismes d'élimination sont aussi efficaces à faible dose (1µg/kg) qu'à forte dose (10mg/kg) et peu de différences ont été observées entre mâles et femelles.

Bien que le nonylphénol soit capable, dans une certaine mesure, de perturber les mécanismes de régulation hormonale, les mammifères ont la capacité, grâce à leurs systèmes métaboliques, d'inactiver et d'éliminer efficacement ce composé. Il est de ce fait peu probable de voir ce type de substance persister longtemps dans les tissus ou s'accumuler dans la chaîne alimentaire.

Publications issues de ce projet

Zalko D, Costagliola R, Dorio C, Rathahao E, Cravedi JP. In vivo metabolic fate of the xeno-estrogen 4-n-nonylphenol in Wistar rats. *Drug Metab Dispos* 2003;31(2):168-78.

Identification de gènes dont l'expression est altérée par les biphényles polychlorés (PCBs) au cours du développement du système nerveux central Relations avec la voie de signalisation des hormones thyroïdiennes Conception et développement de tests de neurotoxicité Jacques Francon et al., 1999

Les biphényles polychlorés (PCBs) sont parmi les substances chimiques dont la présence persistante dans les sols et dans les eaux - et par voie de conséquence dans les aliments - est préoccupante pour la santé de l'Homme. Ces substances sont considérées comme neurotoxiques lors du développement embryofœtal des mammifères.

L'objectif du projet était de déterminer si l'effet neurotoxique des PCBs est dû à une modification de l'expression de certains gènes, au cours du développement embryonnaire et post-natal précoce du système nerveux central (SNC) des mammifères. Le niveau d'expression de ces gènes pourrait servir d'indicateur biologique d'exposition aux PCBs, permettant de mieux cerner le risque pour le développement du SNC, du nouveau-né. Ce projet visait à la mise point de méthodes permettant de mesurer l'effet des PCBs sur l'expression de gènes cibles dans un modèle animal, et de disposer ainsi d'un modèle prédictif de la neurotoxicité de ces substances.

Le rat en développement a servi de modèle expérimental. Les mères gestantes ont reçu quotidiennement diverses doses de PCBs, jusqu'à quelques jours après la naissance. L'analyse a porté sur plusieurs tissus et organes prélevés chez le nouveau né durant cette même période.

A l'aide de méthodes de biologie moléculaire adaptées à la mise en évidence simultanée de variations d'expression, entre deux tissus, de plusieurs gènes, nous avons pu identifier un certain nombre d'entre eux dont l'expression est modulée par les PCBs. Ces variations entre tissus traités ou non ont été trouvées dans divers tissus en développement, dont le cerveau.

Cependant, les pourcentages de variation observés ne permettent pas d'étudier l'effet dose-réponse des PCBs sur l'expression de ces gènes par des techniques moléculaires de mesure à grande échelle. Cette approche a conduit à l'isolement de deux gènes cérébraux, encore inconnus chez le rat, dont l'expression néonatale est altérée par les biphényles polychlorés. L'analyse est actuellement étendue à d'autres gènes cibles des PCBs.

Effet à long terme d'une exposition maternelle au plomb sur le développement psychomoteur ultérieur de l'enfant et de l'adolescent

Guy Huel et al., 1996

Les effets néfastes du plomb, chez l'être humain, sont connus depuis longtemps. L'importance de la dissémination de ce métal dans l'environnement et les graves conséquences sur la santé qui en découlent ont entraîné les instances sanitaires nationales et internationales vers une politique d'éradication. Les enfants semblent particulièrement sensibles aux effets du plomb.

Les propriétés toxiques du plomb, lors d'exposition aiguës ou chroniques, sont bien connues notamment sur le système hématopoïétique, sur le système nerveux central et sur la reproduction. Lors d'exposition à doses "environnementales", c'est-à-dire a priori modérées, les études épidémiologiques montrent de façon quasi unanime un effet sur le cours de la grossesse, le développement staturo-pondéral du fœtus et psychomoteur de l'enfant. Si ces effets ne font plus de doute à l'échelle épidémiologique, les mécanismes par lesquels le plomb induit l'effet nocif sur le système nerveux central du fœtus et du jeune enfant sont actuellement inconnus.

Parmi les nombreuses hypothèses plausibles l'une concerne l'intervention du plomb sur l'inhibition d'une famille d'enzyme (ATPase) impliquée dans le transport au travers de la membrane cellulaire de certains ions (Na⁺K⁺ et Ca⁺).

Ce travail confirme que l'effet d'une exposition au plomb sur le développement psychomoteur ultérieur de l'enfant pourrait être expliqué en partie par l'inhibition partielle de ces transports ioniques membranaires. Ces étapes sont fondamentales dans la transmission du potentiel d'action le long de l'axone qui conduit l'information entre cellules neuronales. L'intervention d'une autre enzyme (ALA-D) pourrait intervenir dans ce mécanisme complexe.

Plusieurs études expérimentales ont suggéré que certains troubles comportementaux pourraient être attribués à des altérations de certains paramètres des fonctions monoaminergiques (impliquant un type de neurotransmetteurs). Peu d'observations chez l'homme ont été réalisées. Nous avons montré que l'effet du plomb sur la sociabilité de l'enfant était partiellement expliqué par le système sérotoninergique.

Du point de vue général, les résultats de cette recherche ne montrent pas de lien significatif entre l'exposition au plomb à la naissance et les performances cognitives et motrices à 17 ans. En première analyse nous pouvons interpréter ce résultat comme la preuve d'une certaine réversibilité apparente des effets neurotoxiques de l'exposition in utero au plomb. Cependant les performances mnésiques paraissent continuées d'être affectées après l'adolescence.

Publications issues de ce projet

Yang HW, Huel G, Campagna D, Hellier G, Boissinot C, Blot P. Neurodevelopmental evaluation of 9-month-old infants exposed to low levels of lead in utero: involvement of monoamine neurotransmitters. J Appl Toxicol 1999;19(3):167-72.

Campagna D, Huel G, Girard F, Sahuquillo J, Blot P. Environmental lead exposure and activity of delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) in maternal and cord blood. Toxicology 1999;134(2-3):143-52.

Campagna D, Huel G, Hellier G, Girard F, Sahuquillo J, Fagot-Campagna A, et al. Negative relationships between erythrocyte Ca-pump activity and lead levels in mothers and newborns. Life Sci 2000;68(2):203-15.

Takser L, Dellatolas G, Bowler R, Laplante N, Huel G. Predictive factors of manual dexterity and cognitive performance at 17 years: a 10-year longitudinal study in a rural area of France. Percept Mot Skills 2002;95(1):15-26.

Huel G, Yazbeck C, Burnel D, Missy P, Kloppmann W. Environmental boron exposure and activity of delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) in a newborn population. Toxicol Sci 2004;80(2):304-9.

Conception et développement d'un test original, le FEGA (Foetal Gonad Assay) permettant de révéler et d'analyser les effets des perturbateurs endocriniens sur le développement fœtal testiculaire

Bernard Jégou et al., 1998

De nombreux agents présents dans notre environnement sont connus pour être nocifs vis-à-vis de la fonction de reproduction mâle et il est frappant de constater que la résurgence du débat sur la détérioration séculaire de plusieurs paramètres de la reproduction masculine coïncide avec les préoccupations croissantes de la population sur la dégradation de l'environnement. Parmi tous les agents susceptibles d'affecter la fonction de reproduction chez le mâle, les xénobiotiques (substances étrangères à l'organisme) font l'objet d'une attention particulière. C'est la raison pour laquelle nous avons voulu approfondir nos connaissances sur l'effet des xénobiotiques, plus particulièrement l'effet des perturbateurs endocriniens qui miment des effets hormonaux, sur le développement du testicule fœtal.

Nous avons utilisé un système de culture organotypique de testicule fœtal de rat afin de rechercher les cibles cellulaires, moléculaires et fonctionnelles de deux hormones de synthèse : le diethylstilbestrol (DES) et l'œstradiol (E2). Au regard des différents comptages cellulaires et des dosages effectués, nous avons pu noter que les 3 types cellulaires testiculaires sont des cibles potentielles des xéno-œstrogènes et que les gonocytes sont les premières cellules atteintes et les plus altérées. Puis nous avons couplé ce système de culture à un logiciel de stéréologie qui permet d'effectuer le comptage accéléré des cellules du testicule fœtal. Plus rapide d'utilisation, ce logiciel nous a permis de valider l'ensemble du test FEGA en étudiant les effets cellulaires et moléculaires du Bisphénol A (perturbateur endocrinien qui entre dans la composition d'emballages plastiques) sur les différentes cellules du testicule fœtal de rat. Ces travaux nous ont permis de bâtir un test robuste d'étude des effets des hormones et xéno-hormones sur la gonade fœtale et d'obtenir des résultats originaux concernant le mode d'action de certaines de ces substances.

Publications issues de ce projet

Lassurguere J, Livera G, Habert R, Jegou B. Time- and dose-related effects of estradiol and diethylstilbestrol on the morphology and function of the fetal rat testis in culture. Toxicol Sci 2003;73(1):160-9.

Incidence d'une exposition in utero au bisphénol A sur l'organogenèse testiculaire

Brigitte Le Magueresse-Battistoni et al., 2000

En début de vie foetale, la gonade est dite indifférenciée. Dans les gonades mâles XY, la différenciation testiculaire démarre vers la mi-gestation chez les rongeurs. Très vite, la testostérone (hormone mâle) sera synthétisée, permettant la masculinisation du tractus urogénital et des organes sexuels secondaires. Récemment, il a été montré que certaines molécules présentes dans l'environnement étaient dotées de propriétés œstrogéniques (propre aux hormones sexuelles femelles) néfastes au développement de la fonction de reproduction chez le mâle.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés au bisphénol A. Ce composé est largement utilisé dans l'industrie du plastique (ex tétines de biberon, canettes de boisson...) et en dentisterie. Or cette molécule mime les effets des œstrogènes. Nous avons donc étudié l'impact d'une exposition in utero au bisphénol A sur la différenciation testiculaire de la descendance mâle. Le travail a été réalisé chez la souris et la dose testée de bisphénol A est compatible avec une exposition environnementale.

Les résultats de cette étude confirment que le bisphénol A franchit la barrière foeto-placentaire. Pour autant, le déroulement de la gestation n'est pas perturbé. De même, le testicule se différencie correctement et les cellules germinales, qui transmettent le patrimoine génétique du père, ne sont pas touchées dans leur capacité à se multiplier ou à se différencier.

Ces conclusions contredisent les publications antérieures menées par Vom Saal et al (Toxicol Ind Health 1998). En revanche, nos résultats sont en accord avec une publication récente de la commission européenne (avril 2002, SCF/CS/PM/3936/ opinion of the Scientific Committee on Food on bisphenol A).

Publications issues de ce projet

Guyot R, Magre S, Leduque P, Le Magueresse-Battistoni B. Differential expression of tissue inhibitor of metalloproteinases type 1 (TIMP-1) during mouse gonad development. Dev Dyn 2003;227(3):357-66.

Guyot R, Odet F, Leduque P, Forest MG, Magueresse-Battistoni BL. Diethylstilbestrol inhibits the expression of the steroidogenic acute regulatory protein in mouse fetal testis. Mol Cell Endocrinol 2004;220(1-2):67-75.

Odet F, Guyot R, Leduque P, Le Magueresse-Battistoni B. Evidence for similar expression of protein C inhibitor and the urokinase-type plasminogen activator system during mouse testis development. Endocrinology 2004;145(3):1481-9.

Etude des potentiels œstrogénomimétiques de molécules issues d'emballages plastiques et comparaison avec les potentiels œstrogénomimétiques de flavonoïdes alimentaires chez le rat mâle et femelle afin d'évaluer les risques liés à ces différentes molécules

Jean-Claude Lhuguenot et al., 2000

Les contaminations de nos milieux de vie et de notre alimentation ne doivent pas être considérées de manière isolée, mais dans leur ensemble. Le cas des phtalates et des bis-phénols présents dans les emballages destinés au contact alimentaire et connus pour migrer dans ces aliments en est un exemple clair.

L'étude a été entreprise en vue d'aborder une évaluation du risque de ces molécules sur une base commune en terme de toxicité, qui pourra être complétée par une analyse des niveaux d'exposition relatifs à chacune de ces contaminations.

Ce projet a établi les potentiels œstrogénomimétique du butylbenzyl phtalate, du bisphénol A (molécules issues de l'emballage) et de l'apigénine (flavonoïde appartenant également à la famille des polyphénols mais provenant de notre alimentation).

Il apparaît que le potentiel oestrogénomimétique des phytoestrogènes (famille à laquelle appartient l'apigénine) est nettement plus élevé que celui observé pour les molécules issues des emballages. Par ailleurs, les niveaux d'exposition du consommateur aux phytoestrogènes sont beaucoup plus importants.

Enfin il a été démontré que ces potentiels oestrogénomimétiques font appel à des mécanismes différents selon les molécules considérées.

Ces résultats indiquent sans ambiguïté que le risque lié à ces molécules relève d'une approche différente sur le plan réglementaire en sécurité alimentaire et pour l'environnement général, même si la nature du danger semble identique.

Publications issues de ce projet

Picard K, Lhuguenot JC, Lavier-Canivenc MC, Chagnon MC. Estrogenic activity and metabolism of n-butyl benzyl phthalate in vitro: identification of the active molecule(s). *Toxicol Appl Pharmacol* 2001;172(2):108-18.

Lassarguere J, Livera G, Habert R, Jegou B. Time- and dose-related effects of estradiol and diethylstilbestrol on the morphology and function of the fetal rat testis in culture. *Toxicol Sci* 2003;73(1):160-9.

Stroheker T, Chagnon MC, Pinnert MF, Berges R, Canivenc-Lavier MC. Estrogenic effects of food wrap packaging xenoestrogens and flavonoids in female Wistar rats: a comparative study. *Reprod Toxicol* 2003;17(4):421-32.

Stroheker T, Cabaton N, Berges R, Lamothe V, Lhuguenot JC, Chagnon MC. Influence of dietary soy isoflavones on the accessory sex organs of the Wistar rat. *Food Chem Toxicol* 2003;41(8):1175-83.

Stroheker T, Picard K, Lhuguenot JC, Canivenc-Lavier MC, Chagnon MC. Steroid activities comparison of natural and food wrap compounds in human breast cancer cell lines. *Food Chem Toxicol* 2004;42(6):887-97.

Micropolluants des eaux à effet modulateur endocrinien : impact sur la formation osseuse et l'angiogénèse au cours du développement

Michèle Lieberherr et al., 2000

Le projet étant actuellement en cours de finalisation, le résumé des travaux réalisés dans le cadre de ce projet n'est pas disponible. Les premiers résultats sont néanmoins mentionnés dans la mise en perspective du thème *Reproduction, développement & environnement*.

Toxicité du plomb et fonction ovarienne

Véronique Machelon et al., 1997

Le plomb est un métal lourd dont la présence à des taux élevés dans l'environnement représente une menace pour la santé publique. Les risques d'intoxication aiguë ou chronique par ingestion ou par inhalation sont multiples : risques professionnels, risques liés à l'environnement (pollution par les déchets industriels, accumulation dans les végétaux et la viande animale), risques liés à la vétusté des habitations (tuyauteries, peintures au plomb).

Le plomb ingéré ou inhalé passe dans la circulation sanguine, il peut être fixé et accumulé (os et dents principalement), mais aussi être libéré et échangé à d'autres tissus. Le remodelage osseux, par exemple, induit une libération non contrôlable de plomb dans l'organisme ce qui rend plus difficile l'appréciation des risques, en particulier des effets retardés.

Dans les expositions à des niveaux élevés, les principaux organes touchés sont le système sanguin, le système nerveux et le système rénal, mais d'autres effets peuvent aussi se manifester au cours d'expositions à long terme et à bas niveaux. Les effets toxiques du plomb sur la reproduction et le développement sont connus depuis plusieurs dizaines d'années. La plupart des travaux ont porté sur le système reproducteur mâle en raison probablement des risques professionnels plus élevés chez les hommes. Cependant, les risques de saturnisme concernent aussi les femmes dont les conséquences peuvent se traduire par une diminution de la fertilité.

Le projet conduit ici visait à préciser les cibles sur l'appareil reproducteur de la femme de l'activité toxique du plomb et plus particulièrement sa toxicité directe sur les cellules ovariennes.

Le follicule ovarien a une double fonction, gamétogène en assurant la maturation complète puis l'émission de l'ovocyte, et endocrinienne en synthétisant les hormones stéroïdes essentielles à la fonction de reproduction. Pour évaluer les risques liés à des contaminations par le plomb, nous avons cherché à mettre en évidence les effets du plomb sur cinq protéines impliquées dans la maturation du follicule ovarien. Pour ce travail nous avons utilisé des cellules ovariennes humaines prélevées chez des femmes traitées en vue d'une fécondation in vitro (FIV) au

moment du recueil de l'ovocyte. Ces cellules ont été mises en culture au laboratoire en présence et en absence de plomb. En parallèle, sur des souris élevées au laboratoire, nous avons étudié les effets du plomb administré par voie intrapéritonéale sur la folliculogénèse ovarienne.

Les expériences réalisées sur les souris ont montré que le plomb s'accumule préférentiellement dans les os, mais on observe aussi une augmentation de la concentration en plomb dans les ovaires de souris intoxiquées. Les expériences réalisées in vitro sur les cellules humaines montrent que le plomb peut pénétrer dans les cellules ovariennes et modifier l'expression et les fonctions de protéines membranaires et cytoplasmiques.

Ces modifications peuvent être à l'origine d'une augmentation de l'atrésie folliculaire, processus qui entraîne la disparition des follicules ovariens avant leur stade de maturation terminale conduisant à la libération d'un ovocyte fécondable. Des perturbations de ce type peuvent induire une hypofertilité et des troubles des fonctions de la reproduction analogues à ceux précédemment décrits dans la littérature chez des femmes exposées au plomb, soit de façon aiguë soit de façon chronique (expositions à de faibles doses mais de façon répétée).

L'ensemble de ces résultats indique, comme cela avait été précédemment montré chez le mâle, que le plomb pourrait affecter la production hormonale et les effets médiés par les hormones. On peut donc le considérer comme un perturbateur endocrinien de l'environnement.

Publications issues de ce projet

Machelon V. Toxicité du plomb et fonctions ovariennes. *Reproduction Humaine et Hormones* 2000;XIII:552-557.

Taupeau C, Poupon J, Nome F, Lefevre B. Lead accumulation in the mouse ovary after treatment-induced follicular atresia. *Reprod Toxicol* 2001;15(4):385-91.

Taupeau C, Poupon J, Treton D, Brosse A, Richard Y, Machelon V. Lead reduces messenger RNA and protein levels of cytochrome p450 aromatase and estrogen receptor beta in human ovarian granulosa cells. *Biol Reprod* 2003;68(6):1982-8.

Taupeau C, Gaudin-Nome F, Lieberherr M, Machelon V. Lead (Pb2+) increases vascular endothelial growth factor (VEGF) production in human post-LH ovarian granulosa cells and potentializes the estradiol effect on VEGF in the MCF-7 breast cancer cell line. *Environ Toxicol Pharmacol* 2004;(sous presse) .

Exposition aux éthers de glycol et fertilité masculine

Luc Multigner et al., 1997

Les éthers de glycols sont des solvants oxygénés présents dans de nombreuses préparations à usage professionnel ou domestique : peintures, encres, vernis, produits d'entretien et de nettoyage, cosmétiques et mêmes dans certaines préparations pharmaceutiques. Il existe près d'une trentaine d'éthers de glycols différents répartis entre des dérivés de l'éthylène glycol et des dérivés du propylène glycol. De nombreuses études expérimentales chez l'animal ont montré que certains éthers de glycol dérivés de l'éthylène glycol tels que le méthyl glycol (EGME) ou l'éthyl glycol (EGEE) sont des toxiques de la reproduction chez le mâle.

Nous avons réalisé une étude épidémiologique destinée à étudier les conséquences éventuelles que pourraient entraîner les expositions professionnelles aux éthers de glycol sur la fertilité masculine. Cette étude a été réalisée parmi des agents de la Ville de Paris et s'est accompagnée d'une évaluation des niveaux actuels d'exposition aux éthers de glycol.

Les expositions aux éthers de glycol sur la période 1990 – 2000 ont été évaluées par questionnaire et par l'examen détaillé de la composition de quelques 700 produits chimiques. Les dosages des métabolites urinaires, mesurant les expositions récentes, ont été réalisés en fin de poste de travail hebdomadaire.

La fertilité, capacité biologique à se reproduire, a été évaluée par l'examen des caractéristiques du sperme et par la mesure de certaines hormones indispensables à la reproduction. Les relations entre fertilité et expositions aux éthers de glycol ont été étudiées en fonction des expositions actuelles (mesurées par les métabolites urinaires) ou des expositions passées (période 1990-2000) en tenant compte des produits employés et de la fréquence et du nombre d'années d'utilisation.

Les résultats obtenus montrent que les métabolites de l'EGME, de l'EGEE et de l'EGBE sont à des concentrations 100 à 1000 fois inférieures à celles observées en France au début des années 1990 chez des salariés professionnellement exposés aux éthers de glycol.

Aucune association significative n'a été mise en évidence entre les niveaux actuels d'expositions aux éthers de glycol et les caractéristiques du sperme ou les niveaux d'hormones. Cependant, les hommes qui ont été dans le passé en contact régulier à des produits contenant des éthers de glycol, possèdent certaines caractéristiques du sperme de moins bonne qualité que les hommes n'ayant pas été en contact avec ces produits. Il s'agit du nombre de spermatozoïdes et du pourcentage de formes normales de spermatozoïdes qui sont diminués alors que d'autres paramètres tels que la mobilité ou la vitalité des spermatozoïdes restent inchangés. Concernant les hormones, et à l'exception d'une légère augmentation de l'une d'entre elle mais dans les limites de la normalité (FSH), aucune différence n'a été observée entre les hommes exposés et les non exposés.

Il est à noter que les valeurs moyennes des caractéristiques du sperme et des hormones, y compris chez ceux qui ont été exposés par le passé à des produits contenant des éthers de glycol, se situent dans les limites de la normalité. Les résultats témoignent, très vraisemblablement, d'effets résiduels d'expositions à une période où les éthers de glycol toxiques pour la reproduction étaient fréquemment présents dans des produits chimiques. Il est admis que, sauf pour des fortes expositions, les effets testiculaires des éthers de glycol sont réversibles dans le temps à condition que l'exposition cesse.

Bien que l'estimation rétrospective des expositions à des produits contenant des éthers de glycol ne permette pas de prendre en compte le rôle éventuel des autres solvants qui les accompagnent (et dont leur toxicité est souvent mal ou pas connue), l'ensemble des résultats observés est cohérent avec ce qui est connu de la toxicité expérimentale des éthers de glycol toxiques pour la reproduction.

Dans le cadre de ce projet, une amélioration substantielle de la sensibilité des dosages urinaires des métabolites des éthers de glycol a été obtenue. Cette méthodologie peut dorénavant être employée dans le cadre de la surveillance des expositions en milieu professionnel.

Publications issues de ce projet

Ben-Brik E, Jerome L, Arnaud I, Yous S, Labat L, Haguenoer JM, et al. Exposure to glycol ethers in a population of French men evaluated by measurement of urinary alkoxy-carboxylic acids. *Int Arch Occup Environ Health* 2004;77(5):368-72.

Impact des pollutions environnementales sur la reproduction de la faune sauvage

Luc Multigner et al., 1999

De nombreuses observations suggèrent que des facteurs environnementaux de nature chimique et générés par l'activité humaine ont un effet délétère sur la fonction de reproduction.

Au cours des dernières décennies, diverses modifications séculaires de la fonction de reproduction, en particulier chez le mâle, ont été rapportées : atteinte de la spermatogenèse ou anomalies du développement de l'appareil génital chez des vertébrés mâles (reptiles, poissons, oiseaux, mammifères). Plusieurs hypothèses pour expliquer ces phénomènes ont été évoquées. L'une d'entre elles est que des substances chimiques générées par l'activité humaine et répandues dans l'environnement pourraient se comporter comme des « perturbateurs endocriniens » en mimant ou en inhibant les effets de certaines hormones. Dans certaines circonstances il est possible de réaliser des études contrôlées auprès de populations animales domestiques ou sauvages. Les informations ainsi obtenues peuvent apporter de la cohérence aux études expérimentales et mieux orienter les études à venir.

Le projet ORCHIDEE a été mis en place pour évaluer l'impact des pollutions environnementales sur la fonction de reproduction des mammifères sauvages. Cette étude s'est déroulée en Guadeloupe profitant des caractéristiques environnementales tout à fait particulières de ce département. La Guadeloupe se caractérise par une utilisation intense de pesticides liée aux activités agricoles (culture de la banane, canne à sucre) entraînant une pollution des milieux naturels. Par ailleurs des écosystèmes vierges de toute pollution directe d'origine humaine coexistent avec des zones agricoles polluées. L'objectif du projet était d'étudier et de comparer, chez des mammifères inféodés à des biotopes pollués et chez des mammifères inféodés à des biotopes dépourvus de toute pollution directe, la fonction de reproduction.

En collaboration avec l'Office National de la Chasse et le Parc National de la Guadeloupe, 210 mammifères (Rat noir, Rat surmulot, Souris domestique et Mangouste) ont été capturés dans 4 écosystèmes : 2 agro systèmes consacrés à la culture bananière et à la canne à sucre et 2 écosystèmes « naturels » caractérisés par une forêt tropicale humide en altitude et une forêt sèche côtière sur îlet. Le nombre d'animaux capturés nous a obligé à restreindre les analyses et seul les rats noirs mâles capturés sur trois sites (culture bananière, forêt tropicale humide et forêt sèche côtière) ont été étudiés.

Les animaux issus de la forêt tropicale humide présentent des caractéristiques particulières. Tout en ayant un âge relatif similaire aux animaux capturés dans l'agrosystème bananier ou dans la forêt sèche côtière, ils présentaient un poids corporel et des caractéristiques reproductives d'animaux sub-adultes n'ayant pas atteint leur maturité sexuelle. Ceci semble s'expliquer par les faibles ressources alimentaires de la forêt tropicale humide. Dans ces conditions, les animaux issus de la forêt tropicale humide ne constituent pas un bon groupe témoin lorsqu'on veut les comparer à un groupe d'animaux issus d'un écosystème pollué.

Les animaux capturés dans les bananeraies présentent des poids relatifs (poids rapporté au poids de l'animal), des organes génitaux et des niveaux de testostérone plus faibles que ceux des animaux de même âge issus de la forêt sèche côtière sur îlot.

Ces résultats suggèrent une influence délétère des facteurs environnementaux (par exemple pollution par les pesticides employés en bananeraies) sur la fonction de

reproduction. Cependant, ces relations sont bien plus complexes étant donnée l'influence majeure des ressources nutritionnelles sur la fonction de reproduction.

Publications issues de ce projet

Bazire A, Schorvaert D, Jouannet P, Multigner L, Auger J. Caractéristiques de morphologie et de mouvements de spermatozoïdes de *Rattus rattus* provenant de trois écosystèmes guadeloupéens : impact probable des pollutions environnementales. *Andrologie* 2000;12:383-384.

Interaction des xénobiotiques avec la protéine de liaison des stéroïdes sexuels (SBP/SHBG)

Conséquences sur leur biodisponibilité in vivo

Michel Pugeat et al., 1997

L'hypothèse selon laquelle la contamination de notre environnement par des produits toxiques peut gravement nuire à notre santé a été vérifiée à l'occasion d'accidents dramatiques de pollution. La question d'une contamination permanente de notre environnement qui dépasserait nos capacités d'adaptation a fait l'objet de nombreuses hypothèses non vérifiées.

La mise en place de moyens innovants permettant la détection de contaminants et l'étude de leur devenir dans l'organisme (accumulation dans les différents tissus, processus d'élimination,...) constitue un préalable indispensable à l'évaluation des risques sanitaires liés à ces substances.

Ce projet s'est intéressé au bisphénol A, composant majeur du plastique très largement utilisé dans les emballages (eau et aliments). Ce produit étranger dont les effets miment ceux des hormones féminines (xénoestrogène), pourrait être un dérégulateur du système endocrinien. Comme les estrogènes naturels, après ingestion, il est transporté dans le sang par une protéine de transport des hormones stéroïdes sexuelles ou SHBG (sex hormone-binding globulin), qui va limiter sa diffusion dans les organes nobles et faciliter son métabolisme avant d'être éliminé.

Ce système n'existe pas chez les rongeurs habituellement utilisés comme animaux de laboratoire dans les tests toxicologiques. Nous avons donc utilisé le modèle d'une souris, qui reçoit de la SHBG humaine purifiée pour étudier spécifiquement l'interaction de cette protéine avec le bisphénol A et son rôle dans le devenir de la molécule dans l'organisme.

Nous avons pu montrer en utilisant du bisphénol A marqué par un traceur d'iode radioactive que cette protéine de transport limitait la diffusion du bisphénol A dans le foie et les testicules, comme elle le fait pour les hormones stéroïdes endogènes.

Dans le cadre de cette étude, nous avons développé un réactif (ici un anticorps) pour le dosage du bisphénol A dans le sérum de sujets normaux et de patients présentant une anomalie du développement ou des troubles de la reproduction.

Ces résultats contribuent à l'évaluation des risques pour la santé humaine des contaminations liées à notre environnement et contribuent à la prise de décision en terme de mesures de sécurité qui s'imposent pour la protection de la santé humaine.

Publications scientifiques issues de ce projet

Dechaud H, Ravard C, Claustrat F, de la Perrière AB, Pugeat M. Xenoestrogen interaction with human sex hormone-binding globulin (hSHBG). *Steroids* 1999;64(5):328-34.b

Bendridi N, LeJeune H, Pugeat M. La fécondité masculine serait-elle menacée par l'environnement ? Rôle potentiel des xénoestrogènes. *Rev Franç Endocrin Clin* 1999;XL.

Bendridi N, Mappus E, Cuilleron C, Grenot C, Pugeat M. Interaction du bisphenol A avec la sex hormone-binding globulin (SHBG) : conséquences sur sa biodisponibilité in vivo. *Ann Endocrin* 2000;4:362.

Bendridi N, LeJeune H, Pugeat M. Xénobiotiques et altération de la fonction de reproduction chez l'homme. *Métabolismes-Hormones-Nutrition* 2001;V(6):281-285.

Bendridi N, Mappus E, Grenot C, Lejeune H, Yves Cuilleron C, Pugeat M. Intravenous injection of human sex steroid hormone-binding globulin in mouse decreases blood clearance rate and testicular accumulation of orally administered 125Iiodobisphenol A. *Steroids* 2002;67(7):637-45



Cancer et environnement

Robert Barouki

Inserm, Université Paris V

Membre du Conseil scientifique du programme
de recherche Environnement & Santé

Pr. Philippe Beaune

Faculté de Médecine René Descartes,
Université Paris V

Origine des cancers

Au cours de ces dernières décennies, de nombreux progrès ont été réalisés dans la compréhension des origines et des mécanismes de développement des cancers. Il est admis à présent que les cancers peuvent avoir une origine génétique et une origine environnementale. La part génétique est parfaitement illustrée par le caractère héréditaire de certains cancers, leur agrégation familiale et, dans certains cas, l'identification des gènes responsables. Citons par exemple certains cancers du côlon (HNPCC), une fraction des cancers du sein (gène BRCA), des cancers de la thyroïde. Il faut cependant noter que la contribution génétique ne se résume pas aux maladies héréditaires puisqu'une fraction importante des cancers est associée à une ou plusieurs mutations sporadiques.

La contribution de l'environnement dans l'apparition des cancers a été suspectée depuis longtemps. Dès le 18^{ème} siècle, la fréquence des cancers du scrotum chez les ramoneurs a été associée à leur environnement professionnel (Pott P, 1775). Au cours des dernières décennies, de nombreux exemples de la part de l'environnement dans l'apparition de cancers spécifiques ont été décrits : tabac et cancer broncho-pulmonaire (Hecht, 1999), amiante et mésothéliome (Britton, 2002), rayonnement UV et mélanome (Tucker et Goldstein, 2003), trichloréthylène et cancer du rein (Bruning et Bolt, 2000).

La part effective de l'environnement est très variable selon les différentes estimations, mais ceci dépend principalement de la définition que l'on donne aux facteurs environnementaux. Pris au sens large, l'environnement (par opposition à l'hérédité) recouvre :

- L'environnement chimique qui englobe aussi les habitudes alimentaires (alimentation riche en graisse, en fibres, contamination par des polluants, etc...), le mode de vie (tabac, alcool), l'atmosphère générale ou professionnelle.
- L'environnement physique comme les radiations UV.
- Les infections virales ou bactériennes qui sont aussi à l'origine de plusieurs types de cancers.

Des définitions plus restrictives de l'environnement sont parfois utilisées ; celles-ci excluent les origines infectieuses, nutritionnelles (contenu des régimes en graisses) et de mode de vie (tabagisme actif) pour cantonner la discussion autour de l'exposition à des agents physiques et chimiques, qu'elle soit professionnelle (et souvent massive) ou liée à l'environnement général.

● La part de l'environnement et de l'hérédité

La part relative de l'environnement et des facteurs génétiques dans l'apparition des cancers n'est pas simple à déterminer. Des travaux effectués sur des milliers de jumeaux scandinaves ont permis de faire la part de l'environnement et de l'hérédité dans l'apparition de différents types de cancers (Lichtenstein, 2000). Cette étude montre que la part de l'environnement (pris au sens large) est souvent prédominante, même si cela dépend du type de cancer. Ces observations ont été confirmées dans une étude portant sur des millions d'individus en Suède évaluant le caractère familial de nombreux cancers (Czene, 2002). D'autres travaux effectués sur des conjoints ont aussi amélioré notre connaissance des origines des cancers et notamment la part importante du mode de vie (Heminski, 2001).

● Une séparation artificielle

Une séparation trop tranchée entre mécanismes génétiques et environnementaux semble cependant particulièrement réductrice de nos jours. Il peut paraître intéressant d'établir la contribution (en %) de tel ou tel facteur dans l'apparition des cancers, mais cet exercice est plus complexe qu'il n'y paraît pour des raisons que nous évoquerons ci-dessous.

Premièrement, comme nous l'avons déjà évoqué, la contribution génétique ne se résume pas à la susceptibilité héréditaire à certains cancers, puisqu'il est admis que le développement de cancers est associé à l'accumulation de mutations sporadiques. Il semble exister une relation entre la survenue de ces altérations génétiques et la progression des cellules dans les étapes de la cancérisation (Vogelstein et Kinzler, 1993). Or l'apparition de mutations peut avoir une origine environnementale qu'elle soit physique (irradiation) ou chimique (par exemple certains hydrocarbures aromatiques polycycliques de la fumée de tabac). Il peut donc y avoir une relation causale entre environnement et altération génétique.

Le deuxième point important est qu'il semble à présent assez clair que les effets toxiques liés à l'environnement s'exerceront différemment selon le fond génétique. De même, la pénétrance (qui mesure le degré d'expression du caractère morbide) de certains gènes

de susceptibilité n'est pas complète et peut dépendre de l'environnement. Il est donc difficile de distinguer dans ces cas la part de l'environnement de celle des mécanismes génétiques. Ceci est illustré par des exemples classiques de mutation dans des gènes de réparation de l'ADN et la susceptibilité aux rayonnements UV. Le fond génétique peut intervenir aussi dans la détermination du métabolisme de composés chimiques toxiques d'un point de vue qualitatif et quantitatif. De même la réaction de la cellule à une agression, ses capacités de réparation ou d'apoptose dépendent de son équipement génétique (ces mécanismes sont illustrés dans la figure 1)

Enfin, différentes composantes de l'environnement peuvent interagir entre elles : ainsi dans des pays du tiers-monde, l'apparition de cancers hépatiques est potentialisée par l'infection par le virus de l'hépatite B, la contamination par l'aflatoxine et le profil génétique déterminant le métabolisme de ce composé.

En conclusion, les origines des cancers doivent être examinées selon leur type et leur localisation en tenant compte de l'interaction entre facteurs génétiques et environnementaux, et pour ces derniers entre les différentes composantes de notre environnement.

● Des voies de contamination diverses

L'étude de la contamination par l'environnement doit tenir compte de plusieurs facteurs. La contamination peut se faire par ingestion, inhalation ou par voie transdermique. Elle peut avoir plusieurs origines : alimentaires, professionnelles strictes, thérapeutique, intoxication volontaire ou non, environnement intérieur ou extérieur. Dans certains cas, l'exposition est évitable (tabac actif, alcool...), alors que, dans d'autres cas, elle ne l'est pas (contamination alimentaire ou atmosphérique non suspectée), mais peut être réduite. En ce qui concerne les contaminants chimiques, une bonne connaissance de leur distribution dans l'environnement, des voies de contamination et des propriétés cinétiques et dynamiques dans l'organisme est nécessaire pour définir leur toxicité réelle.

L'étude des expositions professionnelles présente un intérêt particulier dans la mesure où il est plus aisé d'établir une relation entre un contaminant qui est parfois abondant dans ce contexte et bien identifié et l'apparition d'un cancer. Cette analyse sert, selon des modèles à définir, à établir des projections à la population générale de la contribution pathogène de ce contaminant lorsqu'il est présent à faible dose mais de manière prolongée.

● Cancer et interaction gène-environnement

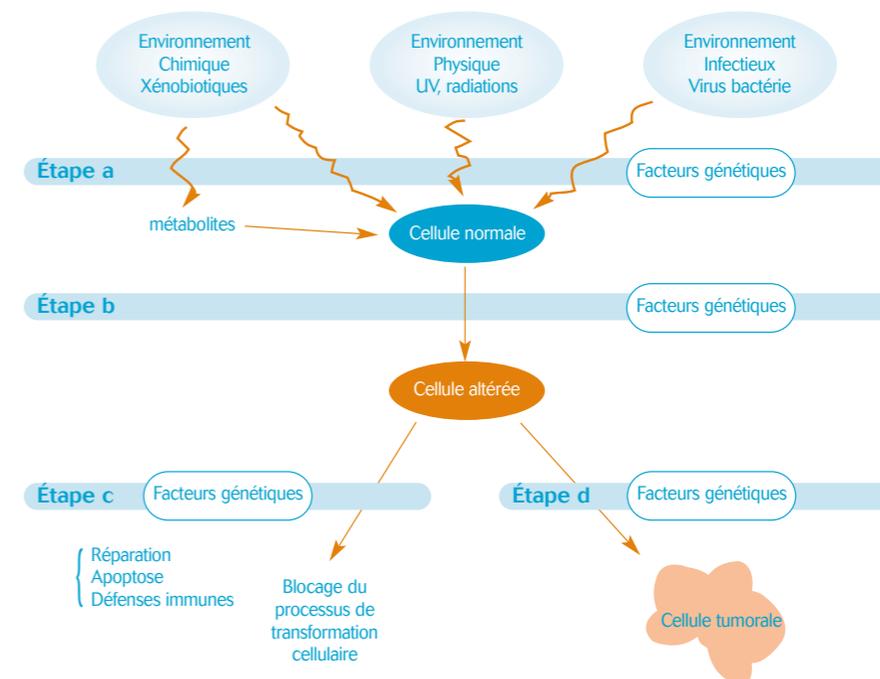


Figure 1. Une cellule est continuellement exposée à diverses agressions environnementales, qu'elles soient physiques, chimiques ou biologiques. Étape a : sa susceptibilité à ces différents stress dépend de son équipement génétique, par exemple sa capacité à dégrader plus ou moins rapidement un polluant. Étape b : des facteurs génétiques peuvent aussi moduler le degré d'altération de la cellule et sa progression par étapes successives vers une cellule cancéreuse. Étape c : en effet, les capacités de défense cellulaire contre cette progression sont multiples et comprennent la réparation, la mort programmée ou apoptose et les défenses immunitaires. Étape d : la variabilité génétique peut affecter l'efficacité de ces défenses et conduire à la transformation tumorale de la cellule.

Les défis et les difficultés des travaux sur environnement et cancer

Les travaux dans ce domaine présentent des difficultés particulières.

Il s'agit d'abord de pouvoir établir une relation entre un facteur environnemental et l'apparition ou l'aggravation d'un cancer. Des études épidémiologiques sont nécessaires et peuvent se focaliser dans un premier temps sur des populations particulièrement exposées que ce soit pour des raisons professionnelles, accidentelles ou géographiques. La difficulté est par la suite de généraliser la notion de risque à la population générale exposée à de faibles doses.

Pour établir de telles relations, une difficulté majeure consiste à identifier et à mesurer l'exposition. Cette exposition ayant pu se produire des années auparavant, il s'agit de pouvoir obtenir une quantification fiable de cette exposition. Il peut s'agir de quantités résiduelles d'un composé chimique ou d'un effet biologique persistant. Cette étape-ci est difficile et fragilise nombre de travaux.

Il est aussi nécessaire d'établir la vraisemblance biologique d'un effet cancérigène, dans le but de définir le véritable risque engendré. Des travaux sur les mécanismes d'action d'un polluant ou d'un facteur de l'environnement sont conduits dans des systèmes modèles. Les modèles animaux sont souvent utilisés mais leur pertinence par rapport à la situation chez l'homme est parfois mise en cause ou non établie. Des modèles *ex vivo* ou *in vitro* provenant d'échantillons humains sont aussi utilisés mais critiqués puisque, justement, ce ne sont pas des études sur organismes entiers. Il est souvent nécessaire de disposer d'un faisceau d'arguments pour conforter la relation entre les propriétés biologiques d'un facteur de l'environnement et son rôle dans l'apparition des cancers.

Enfin, en raison des difficultés pour établir une relation totalement convaincante entre un facteur de l'environnement et un cancer, des questions économiques et sociales délicates peuvent se poser : perception de la dangerosité d'un polluant par le public sans fondement scientifique solide, pertinence des décisions entraînant des conséquences économiques dans ces conditions, analyse économique et sociale de mesures préventives, aide à la décision. Enfin, les analyses génétiques soulèvent des questions éthiques.

Références bibliographiques

Britton M. *The epidemiology of mesothelioma. Semin Oncol* 2002;29(1):18-25.

Bruning T, Bolt HM. *Renal toxicity and carcinogenicity of trichloroethylene: key results, mechanisms, and controversies. Crit Rev Toxicol* 2000;30(3):253-85

Czene K, Lichtenstein P, Hemminki K. *Environmental and heritable causes of cancer among 9.6 million individuals in the Swedish Family-Cancer Database. Int J Cancer* 2002;99(2):260-6.

Hemminki K, Dong C, Vaithinen P. *Cancer risks to spouses and offspring in the Family-Cancer Database. Genet Epidemiol* 2001;20(2):247-57.

Hecht SS. *Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. J Natl Cancer Inst* 1999;91(14):1194-210.

Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, Iliadou A, Kaprio J, Koskenvuo M, et al. *Environmental and heritable factors in the causation of cancer—analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. N Engl J Med* 2000;343(2):78-85.

Pott P. *1775 repris dans Natl.Cancer Inst. Monograph, 1963, 10 : 7*

Tucker MA, Goldstein AM. *Melanoma etiology: where are we? Oncogene* 2003;22(20):3042-52.

Vogelstein B, Kinzler KW. *The multistep nature of cancer. Trends Genet* 1993;9(4):138-41.

Présentation des projets

Ce programme a tenté d'aborder les différentes approches rappelées plus haut dans le domaine du cancer. Une analyse des thèmes privilégiés et de l'évolution de la recherche dans le domaine devrait permettre de mieux définir les priorités à venir.

Les aspects épidémiologiques

Les projets recouvrent différentes applications des analyses épidémiologiques. Ils comprennent des travaux sur des contaminations « accidentelles » comme celles des populations du Vietnam suite à l'épandage d'herbicides contaminés par la dioxine (Parkin et al.1997) qui ont révélé un risque élevé de cancer en général, sans spécificité pour une localisation en particulier, dans la population étudiée. Une autre étude a porté sur les facteurs de risques associés aux

cancers thyroïdiens en Nouvelle Calédonie où un taux anormalement élevé avait été décelé (Guénel et al., 1997). Ces travaux ont montré le rôle important des antécédents de pathologie bénigne de la thyroïde, alors que des facteurs environnementaux suspectés ne semblaient pas impliqués.

Plusieurs projets ont porté sur les leucémies de l'enfant et du sujet jeune. Les projets ont porté soit sur la population générale (Clavel et al., 1997) soit sur la population de Polynésie française (Vathaire (de), et al. 1997). Dans le premier cas un registre national des leucémies aiguës de l'enfant a été établi et l'analyse des données recueillies traduit une stabilité de cette pathologie sur la période 1990-1999 ; par ailleurs une étude géographique plus fine ne semble pas confirmer l'hypothèse de l'existence de variation géographique de l'incidence. Une première analyse des facteurs de risque environnementaux fait apparaître une tendance à l'augmentation de l'incidence dans les zones où le radon domestique est plus élevé que la moyenne et aucun excès de cas de leucémie n'a été mis en évidence chez les enfants résidant aux alentours des sites nucléaires. Ces observations ont été confirmées par l'étude de Laurier et al. (1999) qui était focalisée précisément sur le rôle des rayonnements ionisants. La seconde étude réalisée au sein de la population polynésienne ne semble pas montrer une augmentation du risque de leucémie chez les enfants dont les parents ont travaillé dans des sites d'expérimentation nucléaire ; dans certaines îles, une augmentation de l'incidence de leucémie a été notée pendant la période des essais atmosphériques mais cette observation devra être analysée en fonction des données de contamination de ces îles.

Enfin, ce programme a vu les premières études tentant de corréler les aspects environnementaux et l'équipement génétique des individus (Clavel et al., 1996). Les conclusions de cette étude suggèrent l'existence de plusieurs facteurs de risque de leucémie de l'enfant : antécédents familiaux, consommation de café, exposition aux hydrocarbures, consommation de tabac si elle est associée à des polymorphismes génétiques d'enzymes du métabolisme des xénobiotiques ; il existe aussi des facteurs protecteurs comme l'allaitement prolongé et les infections banales. Au total, plusieurs localisations cancéreuses ont été abordées dans le cadre de ce programme avec des approches focalisées sur un facteur environnemental ou des approches plus globales.

Une meilleure connaissance des expositions

Plusieurs projets avaient pour objectif de mieux évaluer les expositions à des agents connus pour leur activité cancérigène. Ceci est bien entendu essentiel et peut être appliqué par la suite aux études épidémiologiques. Les projets ont porté sur la contamination radioactive générale comme sur le site de la Hague où l'évaluation des concentrations de radionucléotides a été réalisée dans plusieurs compartiments et confrontée aux modèles d'exposition (Chartier, et al. 1997). Un autre projet a consisté à évaluer le taux d'exhalation de radon selon la nature des sols permettant de proposer une cartographie du risque d'exposition (Robe et al., 1997). Enfin, l'exposition aux hydrocarbures aromatiques polycycliques a été évaluée chez les travailleurs présents sur des sites d'anciennes usines à gaz susceptibles d'être contaminées par ces composés. La mesure de la contamination environnementale et chez les individus a permis d'évaluer différents modèles de contamination (Dor et al ; 1997).

Détection et propriétés des contaminants potentiellement cancérigènes

Il n'est pas toujours aisé de doser les différents contaminants chimiques ou physiques et d'évaluer ainsi l'exposition et les risques. Des approches visant à détecter ces contaminants par certains de leurs effets biologiques, ce qui peut faciliter leur criblage, ont été financées. Certains de ces contaminants ne sont pas uniquement des cancérigènes mais leurs effets sur la cancérogenèse ont été rapportés (par exemple les perturbateurs endocriniens). Plusieurs projets ont porté sur l'étude des xénobiotiques à activité œstrogéno-mimétiques. Ainsi, Barouki (1996) montre que des séquences génomiques qui sont les cibles du récepteur de l'œstradiol peuvent constituer la base de nouveaux tests très sensibles de détection des xéno-œstrogènes. De même l'équipe de Nicolas (2000) a pu mettre au point des systèmes cellulaires permettant de détecter de manière rapide et sensible des composés mimant différentes activités hormonales. Dans le même esprit l'équipe de Lhuguenot (2000) a utilisé des cellules testiculaires pour révéler le potentiel œstrogénique de composés présents dans les emballages en contact avec les aliments comme certains phtalates et du bisphénol A.

L'approche de l'équipe de Jégou (1998) a consisté à mettre au point un système plus représentatif du développement et de la physiologie, les cultures organotypiques de testicules fœtaux, pour évaluer de manière plus pertinente le potentiel hormono-mimétique de certains composés. L'ensemble de ces travaux contribue aux efforts de la communauté scientifique dans la mise au point de nouveaux tests biologiques sensibles capables de détecter certains polluants.

D'autres travaux ont été consacrés à l'étude des mécanismes d'absorption et d'élimination de composés chimiques ayant un potentiel cancérigène. Il s'agit par exemple d'un œstrogéno-mimétique, le nonylphénol (Cravedi et al., 1997) et d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) (Fardel et al., 2000). Dans ce dernier cas, des approches permettant l'analyse de l'expression des gènes à grande échelle (grâce aux « puces » à ADN) ont été utilisées pour déterminer les effets des HAP sur des macrophages humains et définir les familles de gènes les plus affectées et en déduire ainsi les fonctions biologiques atteintes par ces polluants. De telles approches sont appelées à se développer et à profiter des développements technologiques importants.

Mécanisme d'action de contaminants chimiques

Parmi les critères permettant de classer les composés chimiques comme cancérigènes, la détermination du mécanisme d'action biologique occupe une place importante. En effet, lorsque les études épidémiologiques et la détermination des expositions suggèrent un rôle cancérigène d'un polluant, il est fondamental que ces données soient compatibles avec les effets biologiques de ces composés et leurs mécanismes d'action toxicologique. Seules ces études expérimentales établissent un lien direct non biaisé entre le composé étudié et les effets biologiques. Une meilleure connaissance des mécanismes d'action est aussi susceptible de fournir des pistes pour des interventions thérapeutiques ou préventives.

La relation entre les fibres d'amiante et les mésothéliomes est une illustration typique de ce qui précède. En effet des modèles expérimentaux ont conforté les données cliniques et devraient permettre d'évaluer le potentiel toxique des fibres de remplacement. Ainsi, Jaurand et al. 2000 et ses collaborateurs ont utilisé des modèles de souris sauvages et mutées (gène *Nf2* fréquemment muté dans les mésothéliomes) pour démontrer que différents types de fibres étaient capables d'induire expérimentalement des mésothéliomes avec une fréquence augmentée chez les souris mutées, ce qui semble conforter les observations cliniques et épidémiologiques.

D'autres travaux ont été consacrés aux mécanismes d'action de la dioxine et au rôle des cytochromes P450 (Barouki et al., 2000). Ces travaux ont des implications en terme d'interactions entre polluants et de relation entre toxicité des xénobiotiques et stress cellulaires. Ainsi, ces auteurs ont montré qu'une partie des effets de la dioxine résulte de l'induction du cytochrome P4501A1, enzyme capable de générer des espèces réactives de l'oxygène au cours de son cycle catalytique. Cette observation rend compte d'observations préalables établissant une relation entre exposition à la dioxine et stress oxydant.

Enfin, plusieurs projets ont été consacrés à l'étude des effets de polluants sur le développement. Il existe une relation très probable entre toxicité fœtale et cancer de la sphère gynécologique bien illustrée par l'exemple du distilbène, hormone de synthèse prescrite aux femmes enceintes dans les années soixante. Des effets de médicaments ou de contaminants hormono-mimétiques sont suspectés sur d'autres localisations. Ainsi, le projet Jégou et al., 1998 visait à étudier les effets des œstrogènes et des perturbateurs endocriniens sur le développement fœtal testiculaire. Il nous apprend que, bien que les trois types cellulaires du testicule (Leydig, Sertoli et gonocytes puissent être la cible de ces composés, les gonocytes) sont les premières cellules atteintes et altérées. Ce type de modèles *in vitro* permet d'appréhender les mécanismes cellulaires et moléculaires au travers desquels l'organe en développement répond aux atteintes toxiques de différents contaminants et conduit dans certains cas au développement à long terme de cancer...

Enfin, des contaminants mimant d'autres systèmes hormonaux ont été étudiés. Plusieurs études avaient indiqué une relation entre les effets des PCB et ceux des hormones thyroïdiennes, en particulier dans le système nerveux central. Ces observations ont constitué la base du projet de Francon et al., 1999 évaluant les effets des PCB sur le développement du système nerveux central et sur l'expression des gènes dans le cerveau de rat. Ces auteurs n'ont pas mis en évidence de fortes similarités entre les hormones thyroïdiennes et les PCB ; ils ont, en revanche, trouvé de nouveaux gènes induits par ces polluants, ce qui devrait leur permettre d'ouvrir de nouveaux champs d'investigation. Même si ces derniers projets n'ont pas une implication immédiate en termes de cancérogenèse, ils concernent le développement d'organes pour lesquels une augmentation de la fréquence des cancers a été rapportée.

Par ailleurs, certains de ces projets ne corroborent pas les hypothèses faites à l'origine, ce qui devrait permettre de mieux cerner les conséquences toxiques réellement reproductibles, et ce qui ouvre souvent de nouveaux axes de recherche.

D'autres projets qui n'avaient pas été conçus initialement comme devant contribuer au renforcement des connaissances dans le domaine du cancer ont conduit à des observations ou des hypothèses qui les rapprochent de cette pathologie. Ainsi, Bellon et al., 1997 ont étudié la toxicité immunitaire des sels de mercure (maladies auto-immunes, sécrétion d'IgE...) et ont identifié les fonctions protectrices des cellules CD8 (lymphocyte T) vis à vis de la toxicité mercurique. Les auteurs signalent que les sels de mercure ont un potentiel cancérigène reconnu, ce qui les amène à proposer que leurs observations pourraient être aussi pertinentes pour cette pathologie. Bien que cette hypothèse reste encore à démontrer, elle semble cohérente avec les connaissances actuelles établissant un lien entre les processus cancéreux et le système immunitaire. Un autre projet (Pipy et al. 1998) avait pour objectif l'étude des effets de certaines mycotoxines sur le système immunitaire et décrit une inhibition de l'immunité à médiation cellulaire, en particulier par les fumonisines fréquemment retrouvées dans le maïs. Comme les mycotoxines sont impliquées dans le développement de certains cancers, les auteurs concluent que leurs observations pourraient expliquer cette toxicité maïs, bien entendu, des travaux supplémentaires sont nécessaires pour valider ces conclusions.

Environnement, économie et société

Comme nous l'avons dit ci-dessus, les risques liés à l'environnement soulèvent des questions d'ordre politique, économique et social. Les risques cancérigènes de l'environnement physique et chimique sont un des éléments essentiels à l'origine de ces questions. Le programme a financé des travaux de nature différente dans ce domaine. Certains projets ont été consacrés à la comparaison des politiques publiques de différents pays dans la gestion des sites contaminés par des produits radioactifs dont le rôle cancérigène n'est plus à démontrer (Massuelle et al., 1998).

Des aspects économiques sont abordés dans le projet de A Rabl et al. 1998 qui est consacré à l'analyse coût-bénéfice des politiques de lutte contre la pollution, avec une attention plus particulière portée à la pollution particulaire de l'air en Ile de France. L'étude montre l'intérêt des mesures d'amélioration de la qualité de l'air dans les effets chroniques principalement, en particulier par l'augmentation de l'espérance de vie, la diminution des pathologies respiratoires et l'amélioration du bien être général de la population. L'étude conclut que les mesures de dépollution des incinérateurs et des véhicules Diesel sont justifiées par l'analyse coût-bénéfice. Enfin, des travaux ont été consacrés au comportement des consommateurs face à la prise de conscience de contaminations possibles des aliments par des polluants biologiques ou chimiques. La perception de ces dangers peut entraîner des modifications de comportement aux conséquences économiques importantes. Divers contaminants ont été analysés comme les nitrates dans l'eau, les OGM, les produits « bio », et la contamination par les métaux lourds. Alors que certains produits provoquent un rejet (OGM), d'autres sont évalués en fonction du supplément de coût justifié par l'achat de produits non contaminés (nitrates, métaux) (Rainelli et al., 1999).

Synthèse et perspectives

Le programme Environnement-Santé a financé plusieurs projets relevant de la thématique « cancer ». La nature de ces projets est très variée, allant des approches épidémiologiques aux approches expérimentales et mécanistiques et enfin aux approches relevant des sciences sociales. Cette diversité reflète l'importance et la complémentarité des différentes méthodologies pour la compréhension de la relation environnement et cancer dans toutes ses dimensions. Le programme s'est efforcé durant la période 1996-2000 de ne pas établir une hiérarchie entre les thématiques mais de ne tenir compte que de la qualité scientifique dans le respect d'un certain équilibre.

La définition de priorités en terme de recherche utiles à la gestion des risques de cancer en lien avec des facteurs de l'environnement a fait l'objet de discussion dans le cadre du Plan National Santé Environnement et du Plan Cancer. D'ores et déjà plusieurs orientations peuvent être suggérées pour améliorer nos connaissances dans le domaine.

Les études épidémiologiques doivent être poursuivies en s'appuyant sur les registres de cancer qui se sont développés afin d'établir des relations avec de nouvelles expositions environnementales insuffisamment explorées. Ces études nécessitent de disposer de mesures fiables traduisant l'exposition à différentes sources de polluants pour consolider les données sur les relations sources-effets. Une des difficultés est de disposer de marqueurs d'exposition au sein de l'organisme.

Les développements technologiques analytiques sont indispensables à cette consolidation, ils permettent de retrouver des traces de composés chimiques dans divers tissus. Une meilleure connaissance du devenir des polluants dans l'organisme (absorption, stockage, métabolisme) pourrait aussi améliorer les connaissances dans le domaine.

Sur le plan toxicologique et biologique, plusieurs directions semblent importantes :

- De nombreuses inconnues demeurent concernant les mécanismes d'action des toxiques. Outre la recherche du mécanisme d'action de nouveaux facteurs environnementaux (champs électriques) et de nouvelles molécules suspectées d'activité cancérigène et l'approfondissement des recherches sur les autres, de nouvelles directions doivent être encouragées : étude des interactions entre plusieurs toxiques (effets cocktails, interaction polluants chimiques-radiations etc...), étude de l'interaction entre des toxiques de l'environnement et d'autres facteurs favorisant (ex : le type d'alimentation), les études des effets à faible dose et au long cours.
- Une meilleure définition des tissus et des périodes du développement à étudier en fonction de l'augmentation de la fréquence de certains cancers (sein, prostate, SNC, leucémie de l'enfant...) est nécessaire. Les expositions *in utero* méritent une attention particulière dans la mesure où elles sont fortement suspectées d'être à l'origine du développement de cancers chez l'enfant. Les études toxicologiques intégrant la plus grande susceptibilité du fœtus sont à l'heure actuelle insuffisamment développées.
- Une classification moléculaire des cancers devrait permettre une meilleure évaluation de la corrélation entre un cancérigène de l'environnement et le type de cancer étudié sur la base de son expression génique. Cette classification nécessite une meilleure définition des types de cancers qui pourra être obtenue grâce aux techniques de génomique (puces à ADN,...) et de protéomique. Ces techniques permettent entre autre d'identifier les

changements d'expression génique entre des cellules tumorales et des cellules normales. Ces approches peuvent conduire à la mise au point de nouveaux marqueurs biologiques (par exemple sériques) d'exposition.

Concernant la gestion du risque, une des composantes pourrait être le développement des techniques de génétique moléculaire facilitant la définition des populations à risque. Ces indications, couplées à des approches épidémiologiques devraient permettre de mieux évaluer le rôle cancérigène de tel ou tel facteur selon l'équipement génétique des individus (par exemple, présence d'un polymorphisme accélérant ou pas le métabolisme d'un cancérigène chimique).

Le champ de l'investigation sociale et économique nécessite aussi des travaux plus approfondis, notamment dans le domaine de la perception des dangers, du coût économique de la pollution, et de la relation coût-bénéfice des décisions des pouvoirs publics.

Dans le domaine du cancer, ce programme a déjà contribué au soutien de la recherche, mais au vu du rôle probable de l'environnement dans l'augmentation du nombre de cancers, il semble évident que la poursuite et l'amplification de ces efforts sont nécessaires dans l'avenir. Il est souhaitable que les efforts en matière de recherche environnement & cancer soient bien coordonnés et qu'ils ne soient pas séparés des autres travaux sur les déterminants environnementaux d'autres pathologies car, comme nous l'avons vu, de nombreux facteurs de risque sont communs à plusieurs d'entre elles (inflammation, pathologie respiratoire, hormonale, cancer...).

Résumés des projets

Détection de xénohormones grâce à l'utilisation de promoteurs hypersensibles aux récepteurs nucléaires

Robert Barouki et al., 1996

Les effets des polluants chimiques suscitent des inquiétudes importantes y compris dans le grand public. La présence de composés présents dans l'environnement et susceptibles de mimer les effets hormonaux (xénohormone) a été rapportée dans plusieurs études et a été associée à diverses manifestations pathologiques dans le règne animal et chez l'homme. La relation de cause à effet est loin d'être établie et nécessite la conduite d'études épidémiologiques, cliniques et mécanistiques longues. Il s'avère donc indispensable de pouvoir rapidement détecter les composés à activité xénohormonale, soit pour pouvoir établir des corrélations avec des manifestations cliniques ou biologiques, soit pour éviter leur diffusion ou leur production à titre préventif.

Ces hormones agissent en modifiant l'expression de nombreux gènes essentiels. Nous avons utilisé cette propriété des hormones ainsi que les outils du génie génétique pour mettre au point un dosage des pesticides qui miment les effets de ces hormones. Il s'agit d'un dosage fonctionnel qui n'est pas fondé sur la structure chimique des polluants (très diverse) mais qui permet de les révéler par leurs effets sur les cellules et sur les gènes.

Cette technique a fait l'objet d'un brevet.

Publications issues de ce projet

Massaad C, Coumoul X, Sabbah M, Garlatti M, Redeuilh G, Barouki R. Properties of overlapping EREs: synergistic activation of transcription and cooperative binding of ER. *Biochemistry* 1998;37(17):6023-32.

Massaad C, Barouki R. An assay for the detection of xenoestrogens based on a promoter containing overlapping EREs. *Environ Health Perspect* 1999;107(7):563-6.

Massaad C, Barouki R. Xénohormones : mode d'action et effets suspects. *Médecine/Sciences* 1999;15:1362-1369.

Massaad C, Entezami F, Massade L, Benahmed M, Olivennes F, Barouki R, et al. How can chemical compounds alter human fertility? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2002;100(2):127-37.

Barouki R, Massaad C, Garlatti M. Brevet n°97 16062: INSERM; 1997 18 décembre 1997. Report No.: 97 16062.

Rôle du cytochrome P450 1A1 dans les effets transcriptionnels de la dioxine

Robert Barouki et al., 2000

Les dioxines sont une famille de molécules produites au cours de la combustion de matières organiques, principalement en présence de chlore. Les usines de traitements des déchets, les industries, les gaz d'échappements libèrent ces molécules dans l'atmosphère. Or les dioxines s'accumulent dans l'organisme (elles sont éliminées très lentement, leur demi-vie est de 7 ans chez l'homme) et se concentrent dans la viande et les produits laitiers. Nous sommes donc tous exposés à des risques dus à une contamination au long terme par les dioxines. Ce travail a pour objectif de mieux comprendre les mécanismes d'action de la dioxine au niveau cellulaire. En effet lorsque la dioxine rentre dans les cellules, elle provoque de nombreux changements : modification de l'expression de gènes, stress oxydant (potentiel mutagène)... L'expression du gène CYP1A1 codant pour un enzyme qui intervient dans l'élimination des xénobiotiques (petites molécules étrangères à l'organisme : polluants, drogues...) hors de la cellule est très fortement augmentée par la dioxine.

Or cette enzyme peut aussi avoir des effets secondaires plus néfastes. Elle produit au cours de son cycle catalytique un stress oxydant qui peut à son tour affecter l'expression de certains gènes et provoquer l'activation de pro-carcinogènes (comme le benzo(a)pyrène, composé présent dans la fumée de cigarette).

En créant des systèmes cellulaires adaptés nous avons pu mettre en évidence la part due au gène CYP1A1 dans les effets cellulaires de la dioxine. Nous avons montré que l'augmentation de l'activité de cette enzyme joue un rôle significatif dans les effets de la dioxine sur l'expression d'autres gènes.

La poursuite de ce travail permettra de mieux comprendre les mécanismes subséquents à l'exposition à la dioxine pouvant déclencher un processus de cancérisation cellulaire. L'objectif à plus long terme est d'identifier une cible moléculaire majoritaire responsable des effets toxiques de la dioxine favorisant ainsi la mise au point d'un mode de blocage des effets de la dioxine.

Les résultats de ces travaux pourraient à terme être transférables aux stratégies de mise en place de traitement de maladies consécutives à de longues expositions aux hydrocarbures (pollutions, population à proximité de certains sites de production, travailleurs exposés...). Plusieurs études indiquent que de nombreux hydrocarbures aromatiques polycycliques activent les mêmes voies métaboliques que la dioxine.

Publications issues de ce projet

Marchand A, Barouki R, Garlatti M. Regulation of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene expression by CYP1A1 activity. *Mol Pharmacol* 2004;65(4):1029-37.

Etude des mécanismes de tolérance aux effets immunopathologiques de certains polluants métalliques

Blanche Bellon et al., 1997

Les dérivés inorganiques du mercure sont présents dans les produits utilisés pour les soins des hommes et des plantes dont ils se nourrissent ; ces dérivés inorganiques sont également présents dans la fumée des cigarettes dont la consommation s'accroît.

Le chlorure mercurique (HgCl₂) est un dérivé inorganique qui peut intervenir dans l'évolution de certains cancers. D'autre part, chez des individus génétiquement prédisposés, une exposition chronique à des doses subtoxiques de mercure inorganique a des effets immunopathologiques tels que, une importante augmentation des IgE (immunoglobuline impliquées dans la genèse de la réaction allergique) sériques, l'induction d'une glomérulopathie auto-immune ou la production d'anticorps dirigés contre des antigènes du soi.

Chez une souche de rats génétiquement susceptibles aux effets de HgCl₂ des injections chroniques subtoxiques de ce dérivé mercurique induisent une maladie qui reproduit les symptômes décrits chez l'homme ; à savoir, une hyperimmunoglobulinémie affectant surtout les IgE; une production d'anticorps dirigés contre des autoantigènes (laminine, ADN) et une glomérulonéphrite auto-immune.

Toutes les manifestations immunes de cette maladie mercurique sont autorégulées. Pour mieux comprendre les mécanismes impliqués dans cette régulation, un modèle de tolérance à la maladie mercurique a été mis au point chez le rat nouveau-né. Ce modèle nous a permis d'identifier le type de lymphocyte T qui conférait une protection contre la maladie mercurique.

Pouvoir manipuler de telles cellules régulatrices, permettrait de s'opposer non seulement aux effets délétères directs des dérivés inorganiques du mercure, mais aussi à leurs effets amplificateurs vis à vis des manifestations impliquant l'IgE comme, par exemple, les réactions allergiques.

Le chlorure mercurique peut avoir un double mode d'intervention dans l'évolution de certains cancers. HgCl₂ interviendrait dans des processus cancérigènes d'une part, parce qu'il peut se lier directement à l'ADN, induire des

cassures et en inhiber la réparation ; d'autre part, parce qu'il induit la production d'IL-6 qui peut favoriser ou même déclencher l'apparition de certains lymphomes ou cancers. Caractériser des populations cellulaires capables de s'opposer à ces deux voies délétères pourrait être une voie d'approche intéressante pour le traitement de certains cancers.

Publications issues de ce projet

Field AC, Caccavelli L, Fillion J, Kuhn J, Mandet C, Druet P, et al. Neonatal induction of tolerance to T(h)2-mediated autoimmunity in rats. *Int Immunol* 2000;12(10):1467-77.

Field AC, Caccavelli L, Fillion J, Kuhn J, Mandet C, Bellon B. Neonatal induction and maintenance of tolerance to Th2-induced immune manifestations in rats. *Transplant Proc* 2001;33(3):2275-6.

Field AC, Bloch MF, Bellon B. Neonatal tolerance to a Th2-mediated autoimmune disease generates CD8+ Tc1 regulatory cells. *J Autoimmun* 2003;21(3):201-12.

Field AC, Caccavelli L, Bloch MF, Bellon B. Regulatory CD8+ T cells control neonatal tolerance to a Th2-mediated autoimmunity. *J Immunol* 2003;170(5):2508-15.

Evaluation de l'exposition des riverains aux rejets radioactifs d'une installation nucléaire

Michel Chartier et al., 1997

Résumé non communiqué. Projet brièvement mentionné dans la mise en perspective du thème Cancer & Environnement

Facteurs de risques environnementaux et génétiques des leucémies aiguës de l'enfant

Jacqueline Clavel et al., 1996

Ces travaux avaient pour objectif l'étude du rôle de l'environnement physique, chimique et microbiologique dans l'étiologie des leucémies aiguës de l'enfant. Les analyses ont porté sur différents facteurs de l'environnement direct de l'enfant ou de ses parents et sur l'existence de certains antécédents familiaux.

Nous avons réalisé une étude cas-témoins multicentrique dans laquelle étaient éligibles comme cas tous les enfants atteints avant l'âge de 15 ans d'une leucémie aiguë (LA), hospitalisés dans les services d'hématologie pédiatrique de Lille, Lyon, Nancy et Paris. Les cas survenus dans les suites d'une radiothérapie ou d'une chimiothérapie pour un premier cancer n'étaient pas éligibles.

Les témoins étaient des enfants hospitalisés dans les mêmes hôpitaux que les cas, pour un motif autre qu'un cancer ou une malformation congénitale. Le recrutement était stratifié sur l'âge (± 1 an), le sexe. L'échantillon était constitué de 280 cas et 288 témoins recrutés du 1/1/1995 au 15/12/1999. Le recueil de données comportait une interview en face-à-face et un prélèvement de sang qui a été obtenu pour 219 cas et 105 témoins.

- **Allaitement maternel.** Les cas ont été moins souvent et moins longtemps allaités que les témoins, l'allaitement prolongé de 6 mois et plus paraissant protéger du risque de LA. Les autres caractéristiques périnatales n'étaient pas associées aux leucémies de l'enfant.
- **Infections banales précoces.** Il a été suggéré que les infections banales de la petite enfance pouvaient avoir un rôle protecteur sur le risque de leucémie aiguë lymphoblastique. Nous avons testé cette hypothèse en étudiant les antécédents d'infections banales de la petite enfance, d'une part, et les facteurs susceptibles d'influencer la survenue de ces infections (rang de naissance, mode de garde) d'autre part. Les antécédents d'infections banales avant l'âge de 2 ans étaient nettement moins fréquents chez les enfants atteints de leucémie que chez les témoins, surtout s'ils avaient été gardés en crèche.
- **Consommation maternelle de tabac et de boissons.** Globalement, la consommation de tabac de la mère ou du père avant, pendant ou après la grossesse était comparable chez les cas et chez les témoins. En revanche, les consommations d'alcool et de café étaient plus élevées chez les mères des cas que chez celles des témoins.
- **Exposition environnementale aux hydrocarbures.** Les cas avaient significativement plus souvent et plus longtemps habité un logement mitoyen d'une station-service ou d'un garage, cet effet augmentant avec la durée de l'exposition résidentielle. En revanche, la proximité de la résidence par rapport aux routes à grande circulation était aussi fréquente chez les témoins que chez les cas.

- **Gènes de prédisposition.** Certaines mutations de gènes d'enzymes impliquées dans le métabolisme de composants de la fumée de tabac semblaient augmenter la susceptibilité des enfants de mère fumeuse à développer une leucémie. En effet, la concomitance de ces mutations et d'une exposition in utero au tabac maternel était environ 2 fois plus souvent retrouvée chez les cas que chez les témoins.
- **Antécédents familiaux de cancer.** Les enfants atteints de leucémie avaient plus souvent des antécédents familiaux de cancer, notamment d'hémopathie maligne, parmi leurs apparentés du 1er degré (parents et frères et sœurs) ou du 2e degré (grands-parents, oncles et tantes).
- **Antécédents familiaux de maladie auto-immune.** Nous avons observé une fréquence plus élevée des antécédents familiaux de maladies auto-immunes parmi les cas que parmi les témoins, plus particulièrement pour les pathologies thyroïdiennes possiblement auto-immunes. Les antécédents familiaux de cancer et de maladies auto-immunes se comportaient comme des facteurs de risque indépendants, aux effets multiplicatifs.

D'autres analyses sont en cours. Elles concernent notamment sur rôle des expositions aux pesticides domestiques dans le risque de leucémie de l'enfant.

Publications issues de ce projet

Perrillat F, Clavel J, Jaussent I, Baruchel A, Leverger G, Nelken B, Philippe N, Schaison G, Sommelet D, Vilmer E, Bonaiti-Pellie C, Hémon D. Family cancer history and risk of childhood acute leukemia (France). *Cancer Causes Control*. 2001;12(10):935-41.

Perrillat F, Clavel J, Jaussent I, Baruchel A, Leverger G, Nelken B, et al. Breast-feeding, fetal loss and childhood acute leukaemia. *Eur J Pediatr* 2002;161(4):235-7.

Perrillat F, Clavel J, Auclerc MF, Baruchel A, Leverger G, Nelken B, Philippe N, Schaison G, Sommelet D, Vilmer E, Hémon D. Day-care, early common infections and childhood acute leukaemia: a multicentre French case-control study. *Br J Cancer*. 2002;86(7):1064-9.

Perrillat-Menegaux F, Clavel J, Auclerc MF, Baruchel A, Leverger G, Nelken B, Philippe N, Sommelet D, Vilmer E, Hémon D. Family history of autoimmune thyroid disease and childhood acute leukemia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2003 ;12(1):60-3.

Steffen C, Auclerc MF, Auvrignon A, Baruchel A, Kebaili K, Lambilliotte A, et al. Acute childhood leukaemia and environmental exposure to potential sources of benzene and other hydrocarbons; a case-control study. *Occup Environ Med* 2004;61(9):773-8.

Facteurs de risques environnementaux des leucémies aiguës de l'enfant

Jacqueline Clavel et al., 1997

Le projet comportait deux études visant à explorer le rôle de l'environnement résidentiel dans les leucémies des enfants. Ces deux études s'inscrivaient dans le cadre du programme de recherche du Registre National des Leucémies et Lymphomes de l'Enfant (RNLE).

- Une analyse des variations géographiques et/ou dans le temps de l'incidence des leucémies de l'enfant sur la période 1990-1996 en lien avec des facteurs environnementaux localisés ou de facteurs infectieux.
- Une étude cas-témoins en population générale basée sur le registre, portant sur des facteurs environnementaux liés à l'habitat (type d'habitation, promiscuité, contact avec les animaux, environnement agricole, radon résidentiel).

Ce projet avait pour préalable la reconstitution de 5 années rétrospectives d'inclusion de cas dans le RNLE, créé le 1/1/1995. Les recrutements rétroactif et prospectif ont été menés en parallèle, par recherche active dans les services prenant en charge les cancers de l'enfant. Le RNLE a également bénéficié des données des protocoles thérapeutiques, des services d'admission hospitaliers puis des départements d'information médicale (DIM). Les données démographiques nationales aux recensements de 1990 et de 1999 ont été fournies par l'INSEE et les données entre les recensements ont été interpolées suivant une méthodologie classique.

L'analyse descriptive des 10 premières années d'enregistrement des hémopathies malignes de l'enfant viennent d'être publiées. Elles montrent des taux d'incidence français comparables à ceux des autres pays développés. Sur cette période 1990-1999, l'incidence des leucémies et des lymphomes chez l'enfant de moins de 15 ans était stable, sans la moindre tendance croissante ou décroissante.

Une partie des travaux en cours porte sur l'analyse des variations géographiques de l'incidence, et cherchent si les cas sont plus proches les uns des autres, dans l'espace et dans le temps, que ne le voudrait le hasard. Les premiers résultats ne semblent pas confirmer cette hypothèse.

Les données du RNLE ont également permis de corrélérer l'incidence des leucémies à différentes expositions, notamment à l'exposition environnementale aux radiations ionisantes, en collaboration avec l'IRSN (Institut de Radioprotection et Sûreté Nucléaire). L'incidence des leucémies n'était pas plus élevée à proximité immédiate des installations nucléaires que sur le reste du territoire, quels que soient le type et la puissance des installations. Cette première étude se prolonge actuellement par une analyse de l'incidence des leucémies en fonction des expositions aux radiations ionisantes modélisées autour des sites nucléaires par l'IRSN.

Nous avons observé une tendance à l'augmentation de l'incidence des leucémies, en particulier des leucémies aiguës myéloïdes, dans les zones où le radon domestique était en moyenne le plus élevé d'après les campagnes de mesure de l'IRSN. L'étude est actuellement complétée par une analyse de l'exposition aux radiations gamma telluriques, également émises dans les régions de massifs anciens.

L'étude cas-témoins a été réalisée dans 14 régions en utilisant un auto-questionnaire standardisé. Les témoins ont été recrutés en population générale selon la méthode des quotas assurant la même distribution âge, sexe et région que celle des cas. Cette étude a inclus 472 cas de leucémie aiguë et 567 témoins (taux de réponse de 71 % chez les cas comme chez les témoins). Les infections banales avant l'âge de 1 an étaient moins souvent retrouvées chez les cas de leucémie aiguës lymphoblastique que chez les témoins. Le lien était plus marqué pour les infections digestives. Les cas avaient été moins souvent et plus tardivement gardés en collectivité que les témoins.

D'autres analyses sont en cours et notre programme de recherche est à présent étendu à l'étude du rôle de l'environnement chimique, physique et biologique sur plusieurs cancers de l'enfant, en interaction ou non avec des facteurs de susceptibilité génétique.

Publications issues de ce projet

Clavel J, Goubin A, Auclerc MF, Auvrignon A, Waterkeyn C, Patte C, et al. Incidence of childhood leukaemia and non-Hodgkin's lymphoma in France: National Registry of Childhood Leukaemia and Lymphoma, 1990-1999. *Eur J Cancer Prev* 2004;13(2):97-103.

Evrard A, Hémon D, Billon S, Laurier D, Tirmarche M, Clavel J. Ecological Association between domestic radon exposure and childhood leukaemia incidence in France, 1990-1998. *Eur J Cancer Prev* sous presse.

Jourdan-Da Silva N, Perel Y, Mechinaud F, Plouvier E, Gandemer V, Lutz P, et al. Infectious diseases in the first year of life, perinatal characteristics and childhood acute leukaemia. *Br J Cancer* 2004;90(1):139-45.

White-Koning ML, Hemon D, Laurier D, Tirmarche M, Jouglu E, Goubin A, et al. Incidence of childhood leukaemia in the vicinity of nuclear sites in France, 1990-1998. *Br J Cancer* 2004.

Métabolisme chez le rat

et chez l'homme d'un xénoestrogène : le nonylphénol

Jean-Pierre Cravedi et al., 1997

Le résumé figure dans les recherches conduites sur le thème *Reproduction, Développement & Environnement*.

Facteurs de risque des leucémies du sujet jeune en Polynésie française

F. de Vathaire et al., 1997

L'objectif du projet était d'étudier les facteurs de risque des leucémies de l'enfant et du jeune adulte entre 1979 et 1996 en Polynésie française (Polynésie Française) en mettant l'accent sur le rôle potentiel du travail du père dans les centres d'expérimentation nucléaire et en recherchant d'éventuel agrégat géographique.

Cette étude a porté sur 52 cas de leucémies diagnostiquées entre janvier 1979 et décembre 1996 chez les sujets âgés de 0 à 24 ans lors du diagnostic, nés et habitant en Polynésie Française. Chacun de ces cas a été apparié à 2 sujets de la population générale de même sexe et date de naissance, représentatifs de la population générale.

L'analyse des lieux de résidence des enfants au moment de leur naissance a montré que les cas résidaient plus souvent (45 %) dans les zones agricoles et pauvres de la Polynésie Française (Presqu'île de Tahiti, îles sous le Vent hors Moorea, archipel des Australes) que les témoins (23 %). Cette différence était plus marquée pour les sujets nés pendant les essais nucléaires que chez les sujets nés après. Aucune relation n'a pu être mise en évidence avec la

profession d'agriculteur des parents, ni avec l'usage professionnel ou domestique de fongicides, de pesticides ou d'herbicides. Les pères de 7 cas (14 %) et de 21 témoins (22 %) avaient travaillé dans les centres d'expérimentation nucléaire, parmi lesquels 4 (8 %) et 15 (15 %) pendant les essais atmosphériques. L'étude des facteurs alimentaires a montré que les cas avaient une consommation plus importante de poisson du lagon et de noix et de graines que les témoins. Les noms, prénoms et dates de naissance des sujets qui avaient travaillé dans les centres d'expérimentation nucléaire ont été transmis à l'armée et au CEA, afin d'en obtenir la dosimétrie ; la communication de ces données est encore à ce jour incomplète.

En conclusion, cette étude n'a pas permis de montrer une association avec le travail du père dans les centres d'expérimentation nucléaire et l'incidence des leucémies de l'enfant et de l'adolescent en Polynésie Française. Elle n'a pas montré non plus de cluster géographique près de Mururoa. Néanmoins, en l'absence de données sur les doses reçues par les pères, et surtout en l'absence de données fiables et précises sur les contaminations subies par les populations polynésiennes, il n'est pas encore possible de se prononcer définitivement sur l'impact des essais nucléaires sur l'incidence des leucémies de l'enfant et du sujet jeune entre 1981 et 1996. La réalisation de ce premier travail a permis d'initier la réalisation d'une étude actuellement en cours, plus importante, sur les facteurs de risque du cancer de la thyroïde en Polynésie Française.

Validation de modèles d'estimation de l'exposition humaine aux polluants des sols (Etude Solex)

Frédéric Dor et al., 1997

L'exposition des populations aux polluants des sols est principalement évaluée à l'aide de modèles multi compartiments environnementaux (ou multimédia) dont les prédictions n'ont pas fait l'objet de réelle validation. L'étude SOLEX (SOL Exposition) avait pour objectifs de décrire les niveaux d'exposition aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP, contaminants produits par la combustion de matière organique) de salariés présents sur trois sites dont les sols ont été pollués par les activités d'anciennes usines à gaz, et de comparer ces mesures aux prédictions calculées par des modèles multimédia.

Les expositions biologiques ont été mesurées (au travers de la présence du marqueur biologique 1-hydroxypyrene ou 1-HOP, dans les urines) chez 110 salariés présents sur trois sites d'anciennes usines à gaz en novembre 1997 et juin 1998, et 29 ne travaillant pas sur ce type de site, appelés référents. Des mesures d'exposition atmosphérique et cutanée ont aussi été menées sur une trentaine des salariés des sites. Les prédictions ont été estimées par 4 modèles multimédia : AERIS (Canada), CalTOX (Etat de Californie), CLEA-SOLEX (Royaume-Uni), HESP (Pays-Bas). Trois scénarios d'exposition, qualifiés de « bureau, mixte et extérieur » ont été construits sur la base des activités des salariés. Les valeurs des paramètres des modèles ont été standardisées. La comparaison n'a été effectuée qu'avec les groupes de volontaires non fumeurs, du fait du caractère prédominant de l'exposition liée au tabac.

Un excès d'exposition en 1-HOP est décelé chez les travailleurs dépolluant l'un des sites. Ce résultat est confirmé par les mesures atmosphériques et cutanées. Quels que soient le scénario d'exposition et les sites considérés, les niveaux d'exposition calculés par les modèles divergent d'autant plus que les teneurs en pyrène dans le sol s'élèvent. Mises à part les prédictions de CalTOX, qui restent très proches des mesures, la comparaison avec les autres modèles indique une surestimation qui augmente avec les teneurs en pyrène dans le sol. La prépondérance des voies d'exposition diffère aussi selon les modèles.

De cette étude il apparaît que l'exposition des personnes présentes sur un site pollué par les HAP est décelable lorsqu'il y a un contact direct, étroit et important avec le sol, et révèle que la pertinence des modèles n'est pas toujours vérifiée. La conduite de travaux de recherche similaires en vue d'apprécier plus précisément l'exposition dans d'autres situations et pour d'autres polluants est nécessaire. Ce point est particulièrement important pour les enfants dont les jeux les conduisent régulièrement à être en contact avec le sol.

Publications issues de ce projet

Dor F, Dab W, Empereur-Bissonnet P, Zmirou D. Validity of biomarkers in environmental health studies: the case of PAHs and benzene. *Crit Rev Toxicol* 1999;29(2):129-68.

Dor F, Jongeneelen F, Zmirou D, Empereur-Bissonnet P, Nedellec V, Haguenoer JM, et al. Feasibility of assessing dermal exposure to PAHs of workers on gaswork sites—the SOLEX study. *Sci Total Environ* 2000;263(1-3):47-55.

Dor F, Haguenoer JM, Zmirou D, Empereur-Bissonnet P, Jongeneelen FJ, Nedellec V, et al. Urinary 1-hydroxypyrene as a biomarker of polycyclic aromatic hydrocarbons exposure of workers on a contaminated site: influence of exposure conditions. *J Occup Environ Med* 2000;42(4):391-7.

Dor F, Person A, Zmirou D, Empereur-Bissonnet P, Nedellec V, Haguenoer JM, et al. Personal exposure of workers to atmospheric PAHs on gasworks sites—The SOLEX study. *Appl Occup Environ Hyg* 2001;16(6):655-9.

Dor F, Empereur-Bissonnet P, Zmirou D, Nedellec V, Haguenoer JM, Jongeneelen F, et al.

Validation of multimedia models assessing exposure to PAHs—the SOLEX study. *Risk Anal* 2003;23(5):1047-57.

Bases cellulaires et moléculaires de l'absorption, de la cytotoxicité et de l'élimination de cancérogènes chimiques (hydrocarbures aromatiques polycycliques) contaminants de l'environnement

Olivier Fardel et al., 2000

Cette étude a porté sur les effets des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) qui sont des contaminants largement répandus dans l'environnement. Ils sont notamment retrouvés en quantité relativement importante dans la fumée de cigarette, les pollutions atmosphériques et marines (« marées noires »), certains aliments (viande grillée...), certaines eaux de boisson, les gaz d'échappement automobile et dans certaines industries (cokeries, fonderie, préparation du bitume...).

Ces composés sont de puissants toxiques : ils sont ainsi capables de provoquer des cancers, d'altérer le fonctionnement du système immunitaire qui nous défend contre les agressions microbiennes, d'entraîner des risques cardiovasculaires, de diminuer la fertilité chez l'homme et la femme et de conduire à des malformations chez les nouveaux nés.

Dans ce contexte il est particulièrement pertinent d'étudier plus précisément la toxicité de ces composés. Ce projet a pour objectif de décortiquer les mécanismes moléculaires précis responsables des effets toxiques des hydrocarbures aromatiques polycycliques mais également d'identifier des marqueurs biologiques permettant de mesurer chez un sujet le niveau d'exposition aux hydrocarbures aromatiques polycycliques. Ces indicateurs d'exposition sont indispensables aux études d'analyse du risque. Nos travaux de recherche ont été réalisés principalement sur des cellules du sang qui sont facilement accessibles chez tout sujet par simple ponction veineuse. Les résultats obtenus ont conduit notamment à décrypter certains mécanismes de toxicité des hydrocarbures aromatiques polycycliques et à découvrir de nouveaux marqueurs biologiques d'exposition aux hydrocarbures aromatiques polycycliques. Ces travaux pourraient déboucher à long terme sur le développement de stratégies de prévention et/ou de traitement pouvant permettre de remédier aux effets toxiques des hydrocarbures aromatiques polycycliques.

Publications issues de ce projet

Payen L, Courtois A, Langouet S, Guillouzo A, Fardel O. Unaltered expression of multidrug resistance transporters in polycyclic aromatic hydrocarbon-resistant rat liver cells. *Toxicology* 2001;156(2-3):109-17.

Laupeze B, Amiot L, Sparfel L, Le Ferrec E, Fauchet R, Fardel O. Polycyclic aromatic hydrocarbons affect functional differentiation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 2002;168(6):2652-8.

Vernhet L, Allain N, Le Vee M, Morel F, Guillouzo A, Fardel O. Blockage of multidrug resistance-associated proteins potentiates the inhibitory effects of arsenic trioxide on CYP1A1 induction by polycyclic aromatic hydrocarbons. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;304(1):145-55.

Van Grevenynghe J, Rion S, Le Ferrec E, Le Vee M, Amiot L, Fauchet R, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit differentiation of human monocytes into macrophages. *J Immunol* 2003;170(5):2374-81.

Huc L, Sparfel L, Rissel M, Dimanche-Boitrel MT, Guillouzo A, Fardel O, et al. Identification of Na⁺/H⁺ exchange as a new target for toxic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Faseb J* 2004;18(2):344-6.

Sparfel L, Huc L, Le Vee M, Desille M, Lagadic-Gossman D, Fardel O. Inhibition of carcinogen-bioactivating cytochrome P450 1 isoforms by amiloride derivatives. *Biochem Pharmacol* 2004;67(9):1711-9.

Van Grevenynghe J, Sparfel L, Le Vee M, Gilot D, Drenou B, Fauchet R, et al. Cytochrome P450-dependent toxicity of environmental polycyclic aromatic hydrocarbons towards human macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;317(3):708-16.

Identification de gènes dont l'expression est altérée par les biphényls polychlorés (PCBs) au cours du développement du système nerveux central.

Relations avec la voie de signalisation des hormones thyroïdiennes.

Conception et développement de tests de neurotoxicité.

Jacques Francon et al., 1999

Le résumé figure dans les recherches conduites sur le thème *Reproduction, Développement & Environnement*.

Recherche des facteurs de risques alimentaires environnementaux et génétiques des cancers de la thyroïde dans une population à incidence élevée : l'exemple de la Nouvelle-Calédonie

Pascal Guénel et al., 1997

L'incidence des cancers de la thyroïde est élevée dans le Pacifique, mais la situation est particulièrement préoccupante chez les femmes mélanésiennes de Nouvelle-Calédonie chez lesquelles l'incidence atteint des valeurs extrêmement élevées, même si une augmentation récente du nombre de cas peut être expliquée en partie par l'intensification au cours de ces dernières années des pratiques de dépistage du cancer thyroïdien. Nous avons réalisé une étude épidémiologique destinée à rechercher les causes du cancer de la thyroïde sur ce territoire, en axant nos recherches sur les facteurs environnementaux et ceux liés au mode de vie.

L'étude réalisée a porté sur tous les nouveaux cas de cancer diagnostiqués en Nouvelle-Calédonie entre 1993 et 1999, et sur un groupe de témoins tirés au sort dans l'ensemble de la population du territoire qui compte 200 000 personnes. Les cas ont été identifiés dans les laboratoires d'anatomopathologie du territoire et devaient résider en Nouvelle-Calédonie depuis au moins 5 ans pour pouvoir être intégrés dans l'étude. Les témoins ont été tirés au sort dans les listes électorales. Tous les sujets éligibles ont été recherchés et contactés en vue d'un entretien en face-à-face au domicile des sujets. Les données recueillies portent au total sur près de 400 cas et plus de 400 témoins.

Les principales hypothèses qui sont examinées grâce à ces données portent sur :

- La consommation de poissons et de fruits de mer, la consommation d'iode et autres substances à effet goitrogène.
- Le lieu de résidence et le rôle de l'eau de boisson.
- Les facteurs hormonaux et reproductifs.
- Les antécédents de pathologie thyroïdienne bénigne (goitre, nodules thyroïdiens bénins).
- Les antécédents familiaux de cancer de la thyroïde.
- L'exposition aux radiations ionisantes.
- Les habitudes ethnoculturelles en milieu kanak (ex : pratique de purges à l'eau de mer).

Les analyses en cours permettent d'estimer la part des antécédents médicaux, reproductifs, alimentaires et environnementaux dans les cancers de la thyroïde, et permettront aux autorités sanitaires locales de définir les politiques de prévention appropriées.

Validité d'un modèle expérimental pour l'évaluation de l'implication de fibres d'amiante dans l'étiologie du mésothéliome, ainsi que du potentiel toxique de fibres de remplacement de l'amiante

Marie-Claude Jaurand et al., 2000

L'utilisation passée de matériaux à base d'amiante dans les bâtiments pose actuellement un problème important de santé publique, en raison des pathologies respiratoires, fibrose et cancer, susceptibles d'être provoquées par ces matériaux. En effet, l'exposition aux fibres d'amiante s'est accompagnée d'un accroissement du risque de fibrose pulmonaire et pleurale, ainsi que de cancer du poumon et de mésothéliome (un cancer affectant les cellules mésothéliales de la plèvre) chez des sujets exposés professionnellement à ces fibres. La gestion du problème de l'amiante est difficile. Cet agent n'est pas le seul facteur de risque pour l'appareil respiratoire et un certain nombre de questions restent encore en suspens; elles concernent plus particulièrement le risque lié à l'exposition à de faibles doses, le risque éventuel encouru par l'exposition à des matériaux de remplacement, les susceptibilités individuelles, et les mécanismes précis de la cancérogenèse par les fibres, même si des données existent aujourd'hui.

Le projet avait pour objectif principal l'amélioration de la détection et de la compréhension des effets des fibres minérales. Les connaissances actuelles sur les mécanismes de cancérisation des cellules ont permis d'établir que ce processus implique, le plus souvent, la présence de mutations sur plusieurs types de gènes. Ces gènes appartiennent à la catégorie des «gènes du cancer» tels que les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeur.

Dans le cas d'expositions multifactorielles, précisément observées pour l'appareil respiratoire, certaines des mutations détectées ne sont pas nécessairement provoquées par l'agent associé à la survenue du cancer, car elles peuvent résulter de l'action d'autres facteurs exogènes, voire endogènes. Dans le présent travail, nous avons cherché à identifier les mutations provoquées par l'amiante, en nous intéressant à une tumeur grave, associée majoritairement à l'exposition à des particules fibreuses : le mésothéliome. Pour cela, nous avons utilisé des cellules sensibilisées, en créant chez la souris une mutation hémizygote (qui n'affecte qu'une copie du gène) sur l'un des gènes suppresseur de tumeurs (*Nf2*). Ce gène est connu pour être fréquemment modifié dans les tumeurs humaines de mésothéliome. Nous avons comparé l'effet de l'amiante sur ces cellules modifiées et sur des cellules parentales non modifiées.

Les résultats obtenus permettent de postuler que des mutations survenues sur un gène important dans le cancer auraient pour conséquence une augmentation de la sensibilité des cellules aux fibres d'amiante sans que, toutefois, il y ait une incidence sur le délai d'apparition de la tumeur. Le gène *Nf2* augmenterait la probabilité de survenue du cancer, mais ne serait pas le facteur limitant dans la cancérisation des cellules mésothéliales.

Au cours de ce travail, il a été possible d'obtenir des cultures de cellules mésothéliales tumorales de souris qui servent d'outils pour la réalisation d'études sur les effets de fibres de substitution à l'amiante, et sur le traitement des cancers (études précliniques).

L'identification des autres gènes associés à la cancérisation des cellules mésothéliales par exposition aux fibres d'amiante, et la comparaison des effets de ces fibres à ceux d'autres matériaux fibreux, devraient permettre d'identifier des anomalies cellulaires ou mutations spécifiques constitueront des marqueurs de l'exposition, et de tester de nouvelles stratégies thérapeutiques qui tiennent compte des caractéristiques des cellules tumorales.

Publications issues de ce projet

Flury-Feith J, Lecomte C, Renier A, Matrat M, Kheuang L, Abramowski V, et al. Hemizygoty of *Nf2* is associated with increased susceptibility to asbestos-induced peritoneal tumours. *Oncogene* 2003;22(24):3799-805.

Conception et développement d'un test original, le FEGA (Fœtal Gonad Assay) permettant de révéler et d'analyser les effets des perturbateurs endocriniens sur le développement fœtal testiculaire

Bernard Jégou et al., 1998

Le résumé figure dans les recherches conduites sur le thème *Reproduction, Développement & Environnement*.

Exposition environnementale aux rayonnements ionisants et risque de leucémie chez les enfants

Dominique Laurier et al., 1999

A fortes doses d'exposition médicale ou accidentelle, les rayonnements ionisants sont un facteur de risque reconnu de leucémie. Mais l'existence d'un risque associé aux niveaux d'exposition habituellement rencontrés dans l'environnement reste à démontrer. Ce débat est périodiquement alimenté par la découverte d'agrégats de cas de leucémie à proximité de sites nucléaires. Ce projet proposait par une approche épidémiologique d'examiner l'association entre le risque de leucémies chez les enfants et l'exposition environnementale aux rayonnements ionisants (radon et rayonnement gamma) sur l'ensemble du territoire métropolitain.

Un premier volet s'est attaché à apporter des éléments concernant l'exposition de la population française à la radioactivité d'origine naturelle. Les données reposent sur la campagne nationale de mesures conduite par l'Institut de radioprotection et de sûreté nucléaire (IRSN). La base de données comporte plus de 13 000 mesures de concentration de radon domestique sur l'ensemble du territoire métropolitain et plus de 14 000 résultats de mesures de l'exposition aux rayonnements gamma. Le traitement de ces données a permis une réactualisation de l'estimation de l'exposition de la population française à la radioactivité naturelle.

L'estimation de l'exposition due au fonctionnement normal des installations nucléaires est basée sur la modélisation du transfert des rejets atmosphériques dans l'environnement. Les estimations ont été effectuées pour les 19 centres nucléaires de production d'électricité français et pour 5 autres sites. Les doses dans les communes voisines sont très faibles en regard de la radioactivité naturelle, et dans certains cas la distribution spatiale des doses est très éloignée de cercles concentriques.

Dans un deuxième temps ces données d'exposition ont été confrontées avec les données du Registre national des leucémies et lymphomes de l'enfant au cours de la période 1990-1998. Les résultats de cette analyse ont révélé une association écologique positive significative entre l'exposition domestique au radon et l'incidence des leucémies de l'enfant. Cette augmentation, très modérée, était plus marquée pour les leucémies aiguës myéloblastiques que pour les leucémies aiguës lymphoblastiques.

Une première analyse du risque de leucémie à proximité des installations nucléaires a été réalisée sur la base de découpages en zones concentriques centrées sur les sites (0-5, 5-10, 10-15 et 15-20 km). Globalement, aucun excès de cas de leucémie n'a été mis en évidence chez les enfants résidant aux alentours des sites nucléaires. Le risque de leucémie ne montrait de variation ni avec la distance par rapport aux sites, ni avec la puissance des installations nucléaires.

Le projet a permis des avancées importantes, tant dans l'estimation de l'exposition de la population française (exposition naturelle et autour des sites nucléaires) que dans l'estimation du risque de leucémie (taux d'incidence au sein de petites unités administratives). Il a permis la production de nouvelles données (base de données de débit de dose gamma à l'intérieur des habitations) et la réalisation d'analyses jamais effectuées auparavant en France (estimation systématique de l'exposition due au fonctionnement normal des installations nucléaires autrement que dans un cadre réglementaire, analyse de l'incidence des leucémies en fonction de l'exposition au radon sur l'ensemble du territoire métropolitain).

Les résultats de ces travaux pourront servir de base à des développements futurs, tels que l'analyse du risque de leucémie associé à l'exposition conjointe au radon et au rayonnement gamma, et l'analyse du risque de leucémie autour des installations nucléaires intégrant des estimations de doses.

Publications issues de ce projet

Laurier D, Valenty M, Tirmarche M. Radon exposure and the risk of leukemia: a review of epidemiological studies. *Health Phys* 2001;81(3):272-88.

Baysson H, Billon S, Laurier D, Rogel A, Tirmarche M. Seasonal correction factors for estimating radon exposure in dwellings in France. *Radiat Prot Dosimetry* 2003;104(3):245-52.

Etude des potentiels oestrogénomimétiques de molécules issues d'emballages plastiques et comparaison avec les potentiels oestrogénomimétiques de flavonoïdes alimentaires chez le rat mâle et femelle afin d'évaluer les risques liés à ces différentes molécules

Jean-Claude Lhuguenot et al., 2000

Le résumé figure dans les recherches conduites sur le thème *Reproduction, Développement & Environnement*

Gestion des sites contaminés par les substances radioactives : analyse et synthèse des politiques publiques dans divers pays

Marie-Hélène Massuelle et al., 1998

Résumé des travaux non communiqué

Identification de substances chimiques interférant avec les réponses endocrines

Jean-Claude Nicolas et al., 2000

Le résumé figure dans les recherches conduites sur le thème *Eaux & Santé*

Etude sur l'exposition aux herbicides et les conséquences sur le développement de lymphomes non-hodgkiniens et sarcomes des tissus mous Situation au Vietnam

Maxwell Parkin et al., 1997

Pendant la guerre du Viet Nam (1961-1975), l'armée américaine a utilisé de grandes quantités d'herbicides, ceci dans un double but : démasquer les points stratégiques de l'armée vietnamienne, cachés dans les forêts denses, et priver la population vietnamienne de produits agricoles. Même si les régions rurales étaient les plus touchées, presque toute la population a été exposée, soit directement, soit par l'intermédiaire de la chaîne alimentaire. Plusieurs herbicides ont été utilisés. Parmi eux, l'Agent Orange (60 % de la quantité totale), particulièrement dangereux à cause de sa contamination par la dioxine, produit extrêmement toxique et cancérigène. Les lymphomes non hodgkiniens et les sarcomes des tissus mous ont été souvent associés à ce type d'exposition. Cette étude a été menée pour examiner cette association.

La principale difficulté pour mener ce type d'investigation est l'appréciation du niveau d'exposition, donnée d'autant plus difficile à recueillir qu'il s'agit d'exposition passée. Ce projet envisageait de mesurer le niveau d'exposition par trois moyens : (1) l'expérience vécue, (2) l'indice d'exposition basé sur le lieu de résidence au moment des épandages, (3) le dosage de ces contaminants particulièrement persistants dans les tissus adipeux des sujets recrutés.

La combinaison de ces mesures, chacune reflétant partiellement la réalité, devait nous permettre de confirmer l'association herbicide et certains types de cancer. Malheureusement, la détermination de niveau de dioxines (les principaux cancérigènes auxquels la population a été exposée) dans les tissus adipeux est extrêmement onéreuse, et nous n'avons pas pu pour l'instant mener cette étude à son terme. Les premiers résultats à notre disposition indiquent un risque élevé de cancer en général, sans spécificité pour une localisation en particulier, dans la population étudiée.

Ce résultat est en accord avec les autres études sur dioxines et cancer. Il serait néanmoins souhaitable de compléter cette étude par des dosages, en utilisant les échantillons très précieux et très rares de plus de 800 habitants du Sud du Vietnam.

Publications issues de ce projet

Kramarova E, Kogevinas M, Anh CT, Cau HD, Dai LC, Stellman SD, et al. Exposure to Agent Orange and occurrence of soft-tissue sarcomas or non-Hodgkin lymphomas: an ongoing study in Vietnam. *Environ Health Perspect* 1998;106 Suppl 2:671-8.

Etudes des altérations fonctionnelles et moléculaires des cellules impliquées dans la réponse immunitaire par la Fumonisine B1, mycotoxine contaminant l'alimentation de l'homme

Bernard Pipy et al., 1998

Les fumonisines sont des mycotoxines produites par plusieurs espèces de *Fusaria* (champignons parasites des plantes). Ces mycotoxines notamment la fumonisine B1 (FB1) sont retrouvées sur le maïs et dans de nombreux dérivés. Elles peuvent produire des maladies fatales chez les animaux et elles sont soupçonnées de produire chez l'homme des cancers de l'œsophage. Actuellement, on ne dispose que d'informations très partielles quant à leurs impacts sur le système immunitaire. Cependant, la réponse immunitaire joue un rôle clé dans la défense anti-tumorale et anti-infectieuse. Un dysfonctionnement des cellules impliquées dans les mécanismes de défense de l'hôte (macrophages, lymphocytes, cellules épithéliales), peut conduire à des modifications de la réponse immunitaire et peut favoriser l'émergence de pathologies inflammatoires, allergiques, infectieuses et tumorales.

L'objectif de ce projet était d'évaluer et d'analyser dans un premier temps les effets de la toxine FB1 sur les fonctions effectrices des cellules du système immunitaire (lymphocytes, macrophages) et des cellules épithéliales coopérant avec les précédentes au cours d'une infection. Dans un second temps, l'objectif était de déterminer si les altérations des cellules du système immunitaire pouvaient favoriser l'émergence de pathologies infectieuses opportunistes.

Ce projet pluridisciplinaire intégrait deux approches :

- Une approche cellulaire et moléculaire qui a permis d'étudier la dérégulation de la production de molécules effectrices par les macrophages et lymphocytes (cytokines, prostanoïdes, radicaux libres oxygénés) et de préciser les voies de signalisation impliquées.

- Une approche intégrée in vivo qui a permis d'étudier l'influence de l'effet immunomodulateur de la toxine FB1 sur la défense anti-infectieuse de l'organisme vis-à-vis d'un parasite opportuniste non virulent pour un sujet en bonne santé, *Toxoplasma gondii*.

L'analyse des résultats a montré que la toxine FB1 est susceptible d'altérer l'intégrité fonctionnelle des cellules impliquées dans les mécanismes de défense de l'hôte (phagocytes mononucléés, lymphocytes, cellules épithéliales) d'origines murines et humaines. La FB1 altère la production par ces cellules des molécules effectrices (intermédiaires réactifs de l'oxygène, monoxyde d'azote) et des médiateurs immuno-régulateurs (cytokines, prostaglandines).

Ces effets de la toxine FB1 sur les cellules du système immunitaire sont corrélés à une altération de la fonction anti-microbienne des macrophages. Ainsi, sous l'effet de la FB1, la souche non virulente *Beverly* de *Toxoplasma gondii* devient virulente chez la souris. Cette virulence résulte de la suppression de l'activation des macrophages sous l'effet de la toxine, favorisant ainsi l'émergence d'une infection par un agent pathogène opportuniste, ici *Toxoplasma gondii*.

Ces travaux s'inscrivent clairement dans la démarche d'évaluation des risques liés aux mycotoxines pour la santé humaine, ils ont permis d'identifier des altérations induites par la fumonisine B1 sur les cellules impliquées dans les mécanismes de défense de l'hôte notamment sur les macrophages.

Ces changements créent un terrain favorable au développement de pathologies infectieuses par des pathogènes opportunistes.

Publications issues de ce projet

Pinelli E, Poux N, Garren L, Pipy B, Castegnaro M, Miller DJ, et al. Activation of mitogen-activated protein kinase by fumonisin B(1) stimulates cPLA(2) phosphorylation, the arachidonic acid cascade and cAMP production. *Carcinogenesis* 1999;20(9):1683-8.

Analyse coût-bénéfice des politiques de la lutte contre la pollution : validation d'outils à partir du cas de la pollution particulaire de l'air en Ile-de-France

Ari Rabl et al., 1996

Le résumé figure dans les recherches conduites sur le thème Autres recherches - Gestion et perception du risque

Santé, environnement et consommation alimentaire

Pierre Rainelli et al., 1999

Le résumé figure dans les recherches conduites sur le thème Autres recherches - Gestion et perception du risque

Mise au point d'une méthodologie permettant l'élaboration d'un outil cartographique prédictif en vue d'identifier les zones potentiellement exposées à de fortes concentrations de radon

Robé MC et Ielsch G et al., 1997

Le radon est un gaz radioactif d'origine naturelle. Il provient de la désintégration de l'uranium et du radium présents dans la croûte terrestre. Il est présent partout à la surface de la planète. Le radon est un des agents du cancer du poumon, toutefois bien loin derrière le tabac. En effet, le radon peut s'accumuler dans les espaces clos, et notamment dans les maisons jusqu'à des concentrations parfois élevées. La principale difficulté rencontrée dans la gestion du risque relatif au radon dans les bâtiments est liée à la grande variabilité de l'exposition au radon sur le territoire national. Il apparaît alors nécessaire de prévoir les zones où la densité des bâtiments à forts niveaux de radon est susceptible d'être la plus importante.

L'exposition au radon varie en fonction du degré de confinement de l'habitat, du mode de vie des occupants et surtout de l'émission du radon à la surface du sol (exhalation) sur lequel est construit le bâtiment. Ainsi, en vue de cibler de manière plus précise les populations les plus exposées, l'IPSN (Institut de protection et de sûreté nucléaire), en relation avec d'autres organismes, a entrepris une cartographie prédictive du potentiel d'exhalation du radon des sols en France. L'objectif de ce programme de recherche est de proposer une méthode d'identification des zones où les terrains peuvent induire des niveaux élevés de radon en surface.

La démarche adoptée s'appuie sur une quantification du flux de radon en surface, à partir d'une caractérisation précise des propriétés des roches et des sols qui contrôlent la source du radon ainsi que son transport jusqu'à l'interface sol/atmosphère.

Cette méthodologie combine une analyse cartographique des paramètres, au moyen d'un Système d'Information Géographique, et un modèle simplifié du transport vertical du radon par diffusion dans le sol. Cette approche est validée dans différents contextes géologiques.

Les résultats obtenus montrent qu'il est possible d'associer un niveau de potentiel d'exhalation à une entité cartographique, en fonction des propriétés de la roche et du sol qui la caractérise. Quatre classes, correspondant chacune à un potentiel d'exhalation du radon, sont distinguées.

L'application de cette méthodologie au territoire français permettrait de préciser la cartographie du potentiel d'émission du radon des terrains à l'échelle régionale. Cette cartographie est indispensable pour la mise en œuvre d'un programme de gestion du risque lié au radon. Elle servira de guide pour optimiser le dépistage des bâtiments existants à niveaux élevés de radon.

Publications issues de ce projet

Ielsch G, Thieblemont D, Perrin J, Tymen G. Geophysical and geochemical tools for radon mapping on a regional scale. In: Union AG, editor. 1999 Fall Meeting; 1999 16 novembre 1999; 1999. p. v 51A-07.

Ielsch G, Thieblemont D, Labeed V, Richon P, Tymen G, Ferry C, et al. Radon (²²²Rn) level variations on a regional scale: influence of the basement trace element (U, Th) geochemistry on radon exhalation rates. *J Environ Radioact* 2001;53(1):75-90.

Ielsch G, Ferry C, Tymen G, Robé MC. Study of a predictive methodology for quantification and mapping of the radon-222 exhalation rate. *J Environ Radioact* 2002;63(1):15-33.



Autres thèmes de recherches

Edith Legouy,
Agence française de sécurité sanitaire environnemental
Coordinatrice scientifique du programme de recherche
Environnement & Santé

Contexte et connaissances scientifiques

Ces cinq premières années de programme ont appelé des propositions de recherche dans une orientation très large ; l'appel à projet avait un caractère délibérément généraliste. L'analyse des travaux produits a montré que 3 thèmes avaient donné lieu à des recherches nourries, d'où un choix éditorial privilégiant ces trois thématiques. Cette structuration ne doit pas conduire à exclure un ensemble de projets de haute qualité qui présentent dans certains cas des approches méthodologiques déjà décrites dans les autres sections mais sur d'autres objets, ou qui abordent des thématiques pour lesquels la communauté scientifique française est encore peu mobilisée.

Par ailleurs, la coexistence d'autres programmes de recherche animés par le Ministère en charge de l'Environnement et contenant un volet dédié à l'interface environnement-homme, tels que PRIMEQUAL (programme inter organismes pour une meilleure qualité de l'air) ou PNETOX (programme national d'écotoxicologie), ou l'activité propre d'agences dédiées comme celle de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA) pour le domaine alimentaire, ont pu conduire à une sous représentation de certains thèmes dans ce programme.

La diversité des sujets traités ici est néanmoins réelle et a permis d'assurer, au cours de ces cinq années, une veille scientifique variée, tout en contribuant largement au renforcement d'une expertise dans des domaines qui constituent une menace insuffisamment maîtrisée ou un risque émergent. Ces différents projets ont été regroupés en six sections : Air, asthme et allergies ; Alimentation ; Microbiologies ; Neurotoxiques ; Métaux : toxicité, exposition et prévention ; Gestion et perception des risques.

L'hétérogénéité des domaines abordés et le nombre limité de projets conduits dans chacune de ces sections ne permettent pas de dégager des perspectives d'ensemble, ne serait-ce que pour l'un de ces thèmes. Néanmoins, s'impose la nécessité de renforcer, au sein d'un programme en appui aux politiques publiques, les travaux de recherche encore trop peu nombreux sur la gestion et la perception du risque pour faciliter les décisions et en apprécier leur efficacité. Les résultats d'une telle recherche seraient de nature à faciliter la prise de décision et à permettre l'évaluation des politiques mises en œuvre.

Présentation des projets

Air, asthme et allergies

L'augmentation de la fréquence des allergies respiratoires est particulièrement notable dans tous les pays industrialisés depuis une trentaine d'année. Elle affecte principalement les jeunes enfants et adolescents, ce qui en fait une priorité d'intervention traduite récemment dans le plan d'action en «santé environnementale des enfants» de l'Union européenne (programme SCALE juin 2004). La présence accrue dans l'environnement de polluants à potentiel allergénique est une hypothèse avancée pour expliquer une part de cette augmentation.

Est également avancée depuis plusieurs années l'hypothèse «hygiéniste» selon laquelle la réduction des sollicitations très précoces (le nourrisson et le très jeune enfant) du système immunitaire par des agents microbiens (surtout bactériens), du fait de milieux de vie «trop propres» et d'un usage immodéré des antibiotiques, serait en défaveur de « la conversion » du profil immunitaire Th2 qui se produit naturellement après la naissance, laissant persister un profil Th1. Le rôle de l'exposition précoce aux nanoparticules émises par la motorisation diesel est également évoqué.

Dans un même temps, le renforcement des connaissances sur les mécanismes de la réaction allergique et les réactions immunitaires qui lui sont associées permettent d'envisager un rôle protecteur d'autres facteurs de l'environnement.

Trois projets apportent des éléments sur le rôle des facteurs déclenchant ou protecteur de l'environnement et contribuent tous à renforcer l'hypothèse «hygiéniste». Une enquête épidémiologique transversale réalisée en Nouvelle Calédonie (Annesi-Maesano et al. 1999) a constitué un modèle particulièrement intéressant pour définir l'étiologie de la maladie du fait de la coexistence de populations adaptées à un mode de vie occidentale avec une population qui a choisi de conserver des pratiques traditionnelles tout particulièrement celles concernant l'habitat et alimentation. Les travaux de Kauffman et al. 1996, 2000 ont clairement identifié deux facteurs déclenchant la capacité à développer une allergie et l'hyperactivité bronchique, le tabac et la survenue de dégâts des eaux et leur conséquence sur le

développement de microorganismes. Le rôle protecteur du contact dans la toute petite enfance avec des animaux de la ferme a été confirmé et il s'étendrait aux animaux domestiques. L'extension de ce rôle protecteur à l'âge adulte a été observée par Neukirch et al 2000, tout particulièrement si l'exposition à l'environnement protecteur est survenue très tôt dans la vie de l'enfant.

Les aspects cellulaires et moléculaires de la réponse inflammatoire à une inhalation de substances issues de microorganismes ont été analysés sur un modèle souris (Chignard et al., 1997). Cette étude a permis d'identifier deux phases successives dans la réponse, qui chacune mobilise des types cellulaires bien distincts. Les mécanismes de reconnaissance par le système immunitaire d'un produit chimique sont encore mal connus ; ils ont été explorés par Pallardy et al. 1999 qui se sont intéressés dans un système d'étude in vitro aux signaux cellulaires produits par les cellules dendritiques (rôle premier dans la réponse immunitaire) en réponse à l'exposition à deux produits allergisants le nickel et le dinitrochlorobenzène (DNCB).

Alimentation

Force est de constater que l'évaluation du risque lié à la consommation des aliments, que ce risque soit d'origine microbiologique ou chimique, est un domaine qui a été relativement peu investigué dans ce programme, hormis sous l'angle de l'eau de boisson présenté plus haut (section A). Trois projets abordent ici les altérations physiologiques ou les mécanismes d'absorption de contaminants chimiques résultant d'une exposition par voie alimentaire. Deux autres sont présentés dans la section suivante (microbiologie).

Le travail de Bueno et al., 1997 a mis en évidence des altérations fonctionnelles et biochimique de la paroi intestinale après ingestion de nitrate ou de nitrites. Celles-ci n'entraînent pas une augmentation de pathologies digestives dès lors que les expositions correspondent à des doses retrouvées dans l'alimentation normale de l'homme. Ces auteurs avancent l'hypothèse d'un effet bénéfique (réduction de la douleur) de l'ingestion de nitrates dans le cas de certaines pathologies gastriques.

L'importance lors l'évaluation du risque pour l'homme de l'accumulation des toxiques dans l'organisme en fonction des doses utilisées et de la durée des expositions est particulièrement bien illustrée par les travaux de Kofl-Claw et al., 1998. Ces études font la démonstration de la capacité d'adaptation des cellules exposées de façon chronique à des doses décrites comme non cytotoxiques de cadmium, mais conduisant à terme à une bioaccumulation importante du contaminant.

La possibilité d'utiliser les propriétés de substances présentes naturellement dans l'alimentation pour favoriser l'élimination des métaux de l'organisme a été explorée dans le projet de Coudray et al., 1998. Les résultats laissent entrevoir la possibilité d'utiliser à titre préventif un polysaccharide pectique naturel afin de réduire l'absorption du plomb. Cette application nécessite néanmoins des travaux complémentaires.

Microbiologie

Depuis quelques années, l'augmentation de la résistance bactérienne aux antibiotiques en France est devenue une préoccupation majeure car elle conduit à des échecs thérapeutiques, que ce soit en médecine de ville ou à l'hôpital, voire à l'émergence de pathologies plus agressives. Depuis les années 50 l'usage vétérinaire des antibiotiques au sein des élevages s'est très largement répandu. Le projet Andremont et al., 1999 a permis d'évaluer le rôle de l'environnement professionnel dans le développement de la résistance bactérienne au sein de la flore intestinale naturelle des porchers, conduisant à formuler des recommandations de pratique professionnelle au sein de cette population. La formidable capacité d'évolution d'une population bactérienne en fonction de son environnement est remarquablement démontrée par les travaux de Matic et al., 1997, qui évaluent le taux d'acquisition de mutations adaptatives de la bactérie en fonction de son environnement.

La bactérie *Escherichia Coli*, ubiquitaire dans l'environnement, provoque de nombreuses infections humaines. Le pouvoir pathogène de cette bactérie est fortement lié à la production de toxines particulières, les vérotoxines ; néanmoins celles-ci n'expliquent pas seules les variations de virulence observées parmi les cas humains déclarés. Le projet de Forestier et al. 1998 présente une analyse comparative (profil biochimique et génotype partiels) de différentes souches isolées dans l'environnement et chez l'homme, permettant de tracer l'évolution du caractère pathogène de certaines souches et d'identifier le support génétique porteur de ces évolutions. Une vérotoxine particulière de E.Coli est clairement associée à la survenue de syndromes hémolytiques et urémiques chez les jeunes enfants. Les travaux de Desenclos et al. 1999 associent ce risque principalement à la consommation de viande hachée peu cuite et à la transmission interhumaine liée à la vie familiale ou collective du jeune enfant après la survenue de cas.

Les mycotoxines produites par les micro-organismes naturels ingérés par l'homme ou l'animal sont pour la plupart éliminées par la machinerie enzymatique en charge du processus de détoxification. Certains métabolites produits au

cours de ces étapes de détoxification peuvent d'avérer très nocifs pour l'organisme. Il devient essentiel d'apprécier l'absorption, le transport, le métabolisme et l'élimination de ces produits. Le projet de Delaforge et al. 1999 a permis de développer une méthodologie adaptée à l'étude de ces différents aspects.

Un projet concernant la distribution et l'évolution, au sein de son réservoir naturel, du virus Puumala responsable de cas humain de fièvre hémorragique avec syndrome rénal (FSHR), a été financé par le PRES (Cliquet et al. 1999.)

Neurotoxiques

L'exposition répétée à de faibles doses de produits phytosanitaires constitue une menace encore très mal évaluée et qui concerne potentiellement un grand nombre de personnes au travers de nombreuses voies d'exposition (air, eau, alimentation). Les effets des pesticides ou herbicide sur la reproduction ou le développement de cancer ont été évoqués au sein des sections précédentes. Deux études épidémiologiques de grande envergure appréhendent les effets neurotoxiques des pesticides. La première étude (Brochard & Baldi 1997 & 2000), au travers le suivi d'une population d'agriculteurs, a mis en évidence des altérations de certaines fonctions cognitives et s'attachent actuellement à en évaluer la réversibilité. Les travaux de Tzourio et al. 1998 confirment l'existence d'une association entre la maladie de Parkinson et le métier d'agriculteur en même temps qu'ils identifient une susceptibilité génétique portée par des gènes de détoxification de substances toxiques. Ce type d'études bénéficiera à l'avenir des améliorations en cours, auxquelles le PRES a contribué, sur les mesures individuelles d'exposition.

Le projet de Abraini et al., 2000 aborde sur un modèle animal l'impact sanitaire d'une exposition prolongée à de faibles doses d'une substance neurotoxique bien connue, le toluène. L'étude est complétée par une évaluation des effets amplificateurs possible d'une exposition simultanée à des nuisances sonores. Ce projet original est une illustration de l'évaluation des dangers et des risques liés à des expositions multiples, à faibles doses et sur le long terme, problème qui imposera des évolutions conceptuelles et méthodologiques importantes dans les années à venir pour progresser dans la compréhension des phénomènes et la gestion du risque.

Métaux : toxicité, exposition et prévention

Les métaux lourds toxiques (cadmium, chrome, plomb, cobalt, nickel, mercure) sont fréquemment retrouvés dans l'environnement (habitat, sols, eau, alimentation). La présence de ces substances extrêmement persistantes résulte souvent de leur utilisation massive dans l'industrie. Les impacts sanitaires les plus couramment décrits font état d'effets neurotoxiques, d'altérations du développement embryonnaire ou de la fonction de reproduction, dont certains ont été évoqués dans la section correspondante plus haut. Le projet de Druet et al. aborde des effets moins connus que sont les altérations d'ordre immunologique provoquées par des expositions chroniques à des sels de mercure (HgCl₂). Les difficultés d'élimination par l'organisme du cadmium ingéré et des conséquences à terme sur la fonction rénale sont explorées dans le projet de Poujeol et al. 1999 dont les résultats incitent à reconsidérer les seuils d'exposition tolérable pour l'organisme.

Les mesures d'imprégnation de l'organisme sont difficiles : certains métaux sont peu décelables dans les fluides biologiques ; pour d'autres, leur concentration dans ces fluides représentent imparfaitement la bioaccumulation dans les tissus. Une étude d'imprégnation du mercure et du cadmium dans le sang de la population de jeunes hommes résidant en France et DOM-TOM a fait apparaître des distorsions régionales et une mesure d'imprégnation au mercure relativement élevée traduisant à l'époque le retard pris par la France dans la réduction des sources d'émission de ce métal (Huel et al. 1999).

Dans le souci de faciliter les politiques de dépistage et de prévention, le projet de Tubbert-Bitter et al. 1998 évalue la validité du cheveu en tant qu'indicateur d'imprégnation de la population vis-à-vis du risque saturnin. Ce projet souligne l'intérêt d'utiliser, en cas de suspicion de plombémies élevées, un «primo-dépistage» qui par cette technique paraît moins éprouvante pour les enfants

Gestion et perception du risque

Les procédures de gestion de risques appellent le développement de méthodes et d'outils pour orienter et rationaliser les décisions, en particulier le recours aux analyses coût-bénéfice, et une prise en compte de la perception du risque et de ses représentations. L'efficacité des décisions et des procédures de gestion gagnerait à être évaluée de façon régulière, cette étape pouvant aussi nécessiter des développements méthodologiques importants. Quelques projets du programme abordent ces différents aspects.

Une analyse coût-bénéfice des politiques de lutte contre la pollution de l'air conduite dans le cadre du projet de Rabl A et al. 1996, met l'accent sur le coût marginal des effets aigus de la pollution comparés aux effets chroniques et s'intéresse aux réglementations des émissions des incinérateurs et des émissions de particules diesel.

La perception par le consommateur du bénéfice associé à l'amélioration de la qualité sanitaire de différents aliments et l'appréciation du consentement à payer pour ces améliorations ont été analysées. L'eau, les fruits et légumes sont des aliments pour lesquels un risque réel est perçu par le consommateur ce qui se traduit par un consentement à payer important. Par ailleurs le choix du consommateur peut résulter de la méconnaissance des contaminants ou des voies d'exposition, les métaux lourds dans l'alimentation n'apparaissent pas comme une menace pour la santé humaine alors que la présence des organismes génétiquement modifiés (OGM) dans l'alimentation inquiète beaucoup de consommateurs (Rainelli et al. 1999). La représentation sociale du risque en lien avec des zoonoses a été abordée dans le projet de Jouvenot et al. 2000 qui contribue à une connaissance raisonnée des comportements et attitudes des populations vis-à-vis de ce type de risques pour la santé humaine et en facilite la gestion ultérieure.

La réduction des niveaux de plombémie chez des enfants après les chantiers de réhabilitation de logements anciens contaminés confirme la nécessité de procéder à ces travaux. Les auteurs d'une étude (Ginot et al. 1999) formulent néanmoins des recommandations concernant la réalisation de ces chantiers qui, dans certains cas, exposent de façon excessive les enfants aux poussières de chantier contenant du plomb, masquant ainsi les effets bénéfiques attendus de ces réhabilitations.

L'impact psychologique sur des populations exposées à des perturbations environnementales de grande ampleur reste encore peu exploré à ce jour. Le projet de Verger et al. 1996 décrit les effets à long terme des inondations dramatiques survenues au sein d'un département français. Cette étude met en lumière la sensibilité accrue des personnes en lien avec leur niveau de responsabilité au sein de la famille et leur faible niveau de revenu. Elle conclut qu'il est important d'assurer un suivi psychologique post traumatique des populations affectées par des accidents ou catastrophes environnementaux.

Résumés des projets

1 Air, asthme et allergies

Enquête transversale dans l'ensemble des classes de 5e et 4e de Nouvelle-Calédonie : prévalence de l'asthme, de la rhinite allergique, de l'eczéma et de l'hypersensibilité immédiate et facteurs associés

Isabella Annesi-Maesano et al., 1999

L'objectif principal de l'étude ISAAC - NC était de connaître pour la première fois la distribution et les facteurs de risque de l'asthme et des manifestations allergiques infantiles en Nouvelle-Calédonie. Le second objectif visait à comparer les données obtenues en Nouvelle-Calédonie avec celles d'autres pays afin de comprendre l'étiologie de l'allergie infantile en s'aidant des similarités et des différences observées.

Le premier résultat de cette étude est le très bon taux de participation obtenu à partir d'un échantillon exhaustif d'adolescents. Parmi les 7262 adolescents ayant participé, l'asthme et les allergies sont apparus moins fréquents que dans les autres pays du Pacifique ; ils sont également moins fréquents qu'en France métropolitaine. Cependant, les épisodes sont graves, comme le montrent les données sur la prise en charge, et reflètent une utilisation encore trop rare des corticoïdes.

Les facteurs de risque des allergies identifiés dans ISAAC - NC semblent étayer l'hypothèse dite «hygiéniste» sur l'origine des allergies, dont l'asthme allergique. Selon cette hypothèse, l'excès d'hygiène caractérisant les sociétés industrialisées serait responsable du développement des allergies en affectant les capacités du système immunitaire de l'organisme.

Les données recueillies dans ISAAC - NC ont montré que la communauté mélanésienne, dont le mode de vie est toujours traditionnel, souffre significativement moins d'asthme et d'allergies que les populations qui vivent selon le mode de vie occidental.

En ce qui concerne le rôle des animaux dans la survenue de ces pathologies, plusieurs résultats étaient observés, notamment selon le type d'animal, et la fenêtre d'exposition à celui-ci. La présence dans l'environnement quotidien d'un chien, un chat ou un animal de la ferme à la période de l'enquête, était inversement liée à la présence d'une allergie alors qu'avoir un rongeur ou un oiseau y était positivement corrélé. Il est connu que les rongeurs ont un pouvoir

allergisant important. En revanche, les chats, les chiens et les animaux de la ferme sont actuellement vus comme des animaux qui peuvent engendrer un phénomène de tolérance. La présence d'animaux dans l'enfance semblait constituer un facteur de risque, mais il n'était pas possible de déterminer le rôle respectif des rongeurs, des oiseaux, et des autres animaux.

Ce travail a constitué la première étude sur l'asthme et les allergies en Nouvelle-Calédonie. La situation de la Nouvelle-Calédonie constitue un modèle étiologique très intéressant pour l'étude du développement des manifestations allergiques du fait de la coexistence de différents modes de vie. La possibilité de compléter ce travail par d'autres investigations est actuellement à l'étude.

Publications issues de ce projet

Annesi-Maesano I, Oryszczyn MP, Moreau D, Debotte G, Barny S, Deniaud F, et al. Traditional lifestyle is not related to IgE-mediated allergy in New Caledonian adolescents. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:A271.

Annesi-Maesano I, Oryszczyn MP, Moreau D, Barny S, Deniaud F, Noël M, Pierre M. Risk factors for allergic sensitisation to *Blomai Tropicalis* in adolescents in New Caledonian adolescents. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:A722.

Annesi-Maesano I, Oryszczyn MP, Debotte G, Moreau D. Are all the animals equal in the Noah's ark. Risk, selection or protective effect of animal allergens in IgE-mediated allergy. *ISAAC - New Caledonia. Eur Respir J* 2001;18(suppl 33):351s.

Aspects cellulaires et moléculaires de l'inflammation pulmonaire expérimentale d'origine atmosphérique

Michel Chignard et al., 1997

L'air contient de nombreuses particules dont certaines peuvent agir sur la physiologie respiratoire. C'est le cas de substances issues de micro-organismes comme les lipopolysaccharides (LPS) des bactéries à Gram négatif. Ce projet visait à renforcer les connaissances sur les mécanismes cellulaires et moléculaires induits par cette molécule et conduisant à une inflammation pulmonaire. Pour réaliser cet objectif, nous avons travaillé sur un modèle expérimental obtenu chez la souris par instillation intra-nasale de cette substance.

Une des caractéristiques majeures de l'inflammation pulmonaire est la présence de neutrophiles dans les voies aériennes. Ainsi, lors d'une activation par les LPS, les macrophages (phagocytes géants capable de digérer un grand nombre de substances étrangères) alvéolaires synthétisent différentes molécules pro- et anti-inflammatoires régulant la migration des neutrophiles (leucocytes impliqués dans l'élimination de substances spécifiques telles que bactéries, champignon etc) Cette migration s'accompagne d'une altération de la barrière alvéolo-capillaire conduisant à la formation d'un oedème pulmonaire.

Les résultats ont permis d'identifier deux mécanismes distincts conduisant à l'altération de la barrière alvéolo-capillaire au cours de l'inflammation pulmonaire. L'un rapide est dû à l'invasion des poumons par les neutrophiles, et l'autre retardé est totalement indépendant de la présence de ces mêmes neutrophiles.

Nous avons également mis en évidence un phénotype spécifique des macrophages alvéolaires au cours d'une inflammation induite par les LPS. Ainsi, ces cellules sont totalement incapables de freiner le processus inflammatoire contrairement à ce que sont capable de faire les macrophages du péritoine par exemple

Publications issues de ce projet

Salez L, Singer M, Balloy V, Creminon C, Chignard M. Lack of IL-10 synthesis by murine alveolar macrophages upon lipopolysaccharide exposure. Comparison with peritoneal macrophages. *J Leukoc Biol* 2000;67(4):545-52.

Chignard M, Balloy V. Neutrophil recruitment and increased permeability during acute lung injury induced by lipopolysaccharide. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;279(6):L1083-90.

Rôle de facteurs de l'environnement domestique sur l'atopie et l'hyperréactivité bronchique

Etude épidémiologique des facteurs génétiques et environnementaux de l'asthme, l'hyperréactivité bronchique et l'atopie (EGEA)

Francine Kauffmann et al., 1996 et 2000

Il existe une forte augmentation de l'asthme et de l'allergie depuis trente ans. Celle-ci suggère le rôle de facteurs de risque environnementaux qui auraient eux-mêmes évolué dans cette même période. Les facteurs de l'environnement domestique ont fait l'objet de travaux afin de déterminer leur rôle potentiellement nocif. En effet, l'augmentation de l'isolation des

logements suite à la crise énergétique a augmenté l'exposition aux allergènes et irritants domestiques. Cette piste de recherche s'est avérée dans la littérature internationale et dans le programme de recherche EGEA peu concluante. La situation est apparue plus complexe avec un rôle important des événements de l'enfance pouvant modifier le profil immunologique. Les recherches doivent porter tout à la fois sur le rôle de facteurs nocifs dont l'exposition aurait augmenté, et sur celui de facteurs protecteurs dont l'exposition aurait diminué. Des résultats initialement considérés comme inattendus et paradoxaux (rôle protecteur de l'exposition au chat sur la survenue de l'atopie - capacité à développer une allergie- alors qu'il est bien connu que l'exposition au chat peut déclencher des crises d'asthme) ont nécessité des confirmations et font toujours l'objet de controverses.

C'est dans ce contexte que la recherche entreprise dans le cadre du programme Etude épidémiologique des facteurs Génétiques et Environnementaux de l'Asthme, l'hyperréactivité bronchique et l'atopie a permis de montrer le rôle de deux facteurs nocifs et de deux facteurs protecteurs :

- Le tabac augmente le taux des immunoglobulines E, qui jouent un rôle essentiel dans l'allergie ; il augmente la gravité de l'asthme. La survenue de dégâts des eaux favorise le développement de l'allergie chez les enfants.
- A l'opposé, avoir vécu à la campagne s'avère avoir un rôle protecteur, préventif vis à vis de la survenue de l'allergie. Parmi les hypothèses retenues pour expliquer cet effet figure l'hypothèse dite hygiéniste selon laquelle la diminution des contacts avec les agents infectieux (et les contacts avec les animaux de ferme entraînent des contacts avec des agents infectieux) empêcherait la maturation immunologique normale des individus, favorisant la manifestation d'une allergie. De même, l'exposition précoce aux animaux domestiques, comme le chat, apparaît avoir un rôle protecteur. Dans le cas du chat, une hypothèse complémentaire pour expliquer cette observation serait un phénomène d'immunotolérance, en cas d'exposition forte et prolongée.

La recherche des facteurs tant nocifs que protecteurs de l'environnement doit se poursuivre afin de comprendre la survenue et l'évolution des maladies allergiques comme l'asthme.

Publications issues de ce projet

Kauffmann F, Dizier MH, Annesi-Maesano I, Bousquet J, Charpin D, Demenais F, et al. EGEA (Epidemiological study on the Genetics and Environment of Asthma, bronchial hyperresponsiveness and atopy) : descriptive characteristics. *Clin Exp Allergy* 1999;29 Suppl 4:17-21.

Siroux V, Pin I, Oryszczyn MP, Le Moual N, Kauffmann F. Relationships of active smoking to asthma and asthma severity in the EGEA study. *Epidemiological study on the Genetics and Environment of Asthma. Eur Respir J* 2000;15(3):470-7.

Oryszczyn MP, Annesi-Maesano I, Charpin D, Paty E, Maccario J, Kauffmann F. Relationships of active and passive smoking to total IgE in adults of the Epidemiological Study of the Genetics and Environment of Asthma, Bronchial Hyperresponsiveness, and Atopy (EGEA). *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161(4 Pt 1):1241-6.

Kauffmann F, Dizier MH, Annesi-Maesano I, Bousquet J, Charpin D, Demenais F, et al. (Epidemiological study of genetic and environmental factors in asthma, bronchial hyperresponsiveness and atopy. Protocol and potential selection bias). *Rev Epidemiol Sante Publique* 2001;49(4):343-56.

Kauffmann F, Oryszczyn MP, Maccario J. The protective role of country living on skin prick tests, immunoglobulin E and asthma in adults from the Epidemiological study on the Genetics and Environment of Asthma, bronchial hyper-responsiveness and atopy. *Clin Exp Allergy* 2002;32(3):379-86.

Maccario J, Oryszczyn MP, Charpin D, Kauffmann F. Methodologic aspects of the quantification of skin prick test responses: the EGEA study. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111(4):750-6.

Oryszczyn MP, Annesi-Maesano I, Charpin D, Kauffmann F. Allergy markers in adults in relation to the timing of pet exposure: the EGEA study. *Allergy* 2003;58(11):1136-43.

Sensibilisation allergique, asthme, rhinite allergique et infections dans la petite enfance

Françoise Neukirch et al., 2000

La fréquence des allergies respiratoires (asthme et rhinite allergique) a augmenté de façon très importante dans les 30 dernières années dans tous les pays industrialisés, particulièrement chez les sujets jeunes, et ceci constitue actuellement un problème majeur de Santé Publique. Plusieurs études ont bien montré que la fréquence de l'asthme augmentait régulièrement dans les générations successives et que le rôle de l'environnement devait être déterminant, mais les raisons de cette augmentation restent encore largement inconnues. Les premières hypothèses ont été que seule une exposition plus importante à des facteurs d'environnement pouvait expliquer une telle augmentation de prévalence. Une hypothèse plus récente, dite "hypothèse hygiéniste", suggère que l'amélioration des conditions d'hygiène dans lesquelles sont élevés les enfants avec comme conséquence une diminution de l'exposition aux infections, pourrait expliquer en partie l'augmentation des allergies.

L'hypothèse d'un effet protecteur, vis à vis de l'allergie, de l'exposition à certains virus et bactéries, notamment dans la toute petite enfance, a été avancée pour expliquer les relations inverses qui ont été observées en épidémiologie entre des marqueurs indirects de l'exposition aux infections (taille de la fratrie, âge d'entrée en collectivité) et le risque d'allergies respiratoires. Des relations ont aussi été trouvées entre l'exposition à certains animaux ou la vie à la ferme et le risque de développer une sensibilisation aux allergènes de l'environnement dans l'enfance. Cette hypothèse est également basée sur des données immunologiques: les produits bactériens stimulent en effet le système immunitaire dans un sens qui l'oriente vers la lutte contre les infections et non vers la lutte contre les antigènes (allergènes) inoffensifs responsables de réactions d'allergies.

L'objectif de ce projet était de valider cette hypothèse par des études épidémiologiques prenant en compte à la fois le type et la période (ou "fenêtre") d'exposition, recherchant en particulier si la protection est encore observée à l'âge adulte. C'était le premier objectif de notre projet. Le deuxième objectif était de rechercher si des facteurs de susceptibilité individuels (facteurs génétiques) pouvaient modifier la protection éventuelle conférée par l'exposition aux bactéries.

Ce projet a été mené à partir des données françaises de l'étude européenne sur l'asthme (ECRHS: European Community Respiratory Health Survey), dont l'objectif était d'étudier, sur 10 ans, les facteurs de risque et la fréquence de survenue de la sensibilisation allergique et de l'asthme, chez des adultes âgés de 20 à 44 ans, représentatifs de la population générale.

Vingt huit centres, pour la plupart européens, ont participé à cette étude longitudinale, dont 4 en France. Le protocole était strictement standardisé entre les centres. Il comprenait un questionnaire très complet, un examen de la fonction respiratoire, un bilan allergologique et la constitution d'une banque biologique pour conserver du sérum et de l'ADN des sujets participants. De plus, un protocole additionnel a été mis en place dans les centres français pour recueillir des informations sur l'environnement dans lequel avaient vécu les sujets dans leur petite enfance (en particulier contacts avec des animaux et éventuellement vie à la ferme).

Les travaux réalisés indiquent un effet protecteur de l'exposition à l'environnement de la ferme vis à vis du risque d'allergies nasales et de sensibilisation allergique. Cet effet protecteur est d'autant plus marqué qu'il survient tôt dans la vie. En particulier, un effet significatif est observé chez les sujets qui ont vécu la première année de leur vie dans une ferme.

L'effet bénéfique de la ferme sur le risque d'allergies nasales et de sensibilisation allergique n'est observé que chez les sujets porteurs d'une forme particulière d'un gène qui détermine le niveau, dans le sérum, d'un récepteur transportant des fragments de la paroi des bactéries vers le système immunitaire. Nous avons ainsi mis en évidence une interaction entre des facteurs génétiques et le rôle protecteur de l'exposition aux bactéries dans la petite enfance, au moment de la maturation du système immunitaire, ce qui pourrait expliquer en partie l'augmentation des allergies respiratoires dans les pays développés.

Les résultats de cette recherche appuient fortement l'hypothèse hygiéniste en complétant d'autres études épidémiologiques qui avaient retrouvé cet effet protecteur en utilisant d'autres marqueurs d'exposition aux bactéries (taille de la fratrie, mode de garde (en collectivité) des jeunes enfants...).

Publications issues de ce projet

Leynaert B, Neukirch C, Kony S, Guenegou A, Bousquet J, Aubier M, Neukirch F, on behalf of the European Community Respiratory Health Survey. Association between asthma and rhinitis according to atopy and sensitization in a population-based study. *The European Community Respiratory Health Survey (ECRHS)*. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113/1:90-97.

Zureik M, Neukirch C, Leynaert B, Liard R, Bousquet J, Neukirch F.

Sensitisation to airborne moulds and asthma severity in the European Community Respiratory Health Survey: a cross-sectional study. *BMJ* 2002;325:411-414.

Salmeron S, Liard R, Elkharrat D, Muir J-F, Neukirch F, Ellrodt A. Asthma severity and adequacy of management in accident and emergency departments in France: a prospective study. *Lancet* 2001;358:629-635.

Leynaert B, Neukirch C, Jarvis D, Chinn S, Burney P, Neukirch F. Does living on a farm during childhood protect against asthma, allergic rhinitis, and atopy in adulthood? *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:1829-1834.

Leynaert B, Korobaeff M, Jarvis D, Chinn S, Burney P, Neukirch F.

Farm exposure in childhood and the risk of asthma, allergic rhinitis and atopy in adulthood. Results from the European Community Respiratory Health Survey (ECRHS). *International Society for Environmental Epidemiology (ISEE)*. Garmisch-Partenkirchen, 2-5 September 2001. *Epidemiology* 2001.

L'incidence des manifestations allergiques est en augmentation dans les pays industrialisés. Les origines sont multiples: pneumallergènes et habitat confiné, facteur favorisant de la pollution atmosphérique mais aussi exposition à des produits chimiques, à des pesticides ou à des médicaments.

La réaction allergique est caractérisée par une première phase de «sensibilisation» qui correspond à la reconnaissance par le système immunitaire de l'individu exposé au produit «allergisant», et par une deuxième phase «effectrice» correspondant aux manifestations pathologiques après réexposition au même produit. Les mécanismes conduisant à la reconnaissance par le système immunitaire d'un produit «allergisant» sont actuellement peu décrits. Néanmoins, il est établi que la cellule qui va transmettre cette reconnaissance est la cellule dendritique qui sert de «sentinelle» de l'organisme pour les agents «étrangers» (virus, bactéries, protéines, produits chimiques...). Les mécanismes de la sensibilisation à un produit «allergisant» restent méconnus et en particulier les premières étapes impliquant la captation de ce produit par la cellule dendritique et sa présentation aux lymphocytes T du système immunitaire.

Les objectifs de ce travail sont donc de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques de la sensibilisation par les molécules chimiques à l'origine des réactions allergiques, en particulier les étapes impliquant la cellule dendritique. Pour cela, il est nécessaire d'identifier des marqueurs de susceptibilité de la cellule dendritique aux produits sensibilisants. Nous avons choisi d'étudier les voies de signalisation induites par deux haptènes «prototypes» le nickel et le dinitrochlorobenzène (DNCB) dans des modèles de cellules dendritiques humaines en culture. Nous avons pu montrer que le dinitrochlorobenzène induisait des modifications d'activité enzymatique impliquées dans la signalisation intra cellulaire au sein de la cellule dendritique. Dans un deuxième temps, nous avons montré que le nickel et le DNCB induisaient une maturation des cellules dendritiques évaluée par l'expression de marqueurs moléculaires spécifiques de cette évolution. Ces deux haptènes sont également capables d'induire la migration des cellules dendritiques.

En conclusion, ces résultats montrent que des molécules chimiques et des métaux, possédant un pouvoir sensibilisant, activent des voies de signalisation communes dans la cellule dendritique, conduisant à sa maturation et à sa migration du site d'entrée de l'haptène aux ganglions drainant ce site.

Ces résultats contribuent à la compréhension des phénomènes d'allergie liés aux molécules chimiques mais également au développement de modèles prédictifs de l'évaluation du pouvoir sensibilisant de ces produits au travers de l'utilisation du modèle des cellules dendritiques humaines et de marqueurs moléculaires qui traduisent l'état d'activation/maturation de ces cellules, préambule de la réaction immunitaire conséquence de l'allergie.

Publications issues de ce projet

Boisleve F, Kerdine-Romer S, Rougier-Larzat N, Pallardy M. Nickel and DNCB induce CCR7 expression on human dendritic cells through different signalling pathways: role of TNF-alpha and MAPK. *J Invest Dermatol* 2004;123(3):494-502.

2 Alimentation

Etude des altérations anatomiques et fonctionnelles de la paroi intestinale induites par les nitrates et les nitrites de l'alimentation de l'homme

Lionel Bueno et al., 1997

L'alimentation humaine est une source directe (composés naturels) et indirecte (additifs alimentaires, résidus de pesticides, etc) de facteurs capables de moduler les fonctions du tube digestif. Parmi ces facteurs alimentaires potentiellement modulateurs, les nitrates occupent une position controversée. L'homme a essentiellement trois sources de nitrates : les légumes (80 %), l'eau de boisson (10 à 15 %) et les charcuteries pour lesquelles les nitrates sont utilisés comme conservateurs (moins de 10 %).

Les plantes ont la faculté de puiser dans le sol les ions nitrate issus de la transformation bactérienne de l'azote ammoniacal, et peuvent ensuite les assimiler pour synthétiser des protéines. Ainsi, certains légumes comme les laitues ou les carottes sont extrêmement riches en nitrates, même lorsqu'ils sont cultivés en l'absence d'engrais. Les nitrates de l'eau de boisson proviennent essentiellement de la contamination de nappes phréatiques par les engrais azotés et les déjections animales issues des élevages industriels. Enfin, les nitrates peuvent être apportés sous forme d'additif alimentaire comme antimicrobien, stabilisateur de coloration ou développeur d'arôme.

L'hypothèse à l'initiation de ce travail était que les troubles fonctionnels intestinaux, qui affectent environ 15 % de la population occidentale, pourraient être liés à un état "micro inflammatoire" de la muqueuse gastro-intestinale provoqué par l'ingestion prolongée de xénobiotiques (petites molécules étrangères à l'organisme: polluants de l'air de l'alimentation, drogues...) de diverses natures, dont les nitrates et les nitrites.

Nous avons montré que, chez le rat, l'ingestion chronique (2 semaines) de nitrates et de nitrites à des doses correspondant à celles pouvant être trouvées dans l'alimentation humaine, induisait des altérations biochimiques de la muqueuse gastrique (augmentation de l'activité de certaines enzymes). La régulation des contractions intestinales ainsi que l'absorption d'eau par le côlon étaient également modifiées. Cependant, aucune perturbation de la croissance des animaux, ni aucune altération histologique (microscopie optique) de la paroi gastro-intestinale n'ont été observées.

Ces résultats ne permettaient pas de conclure à une réelle toxicité digestive des nitrates chez l'animal sain, les altérations observées pouvant être considérées comme mineures. Nous avons alors élargi le champ de notre étude à la sensibilité viscérale chez l'animal sain et aux états physiopathologiques gastro-intestinaux. Ainsi, nous avons voulu vérifier si pour un même taux d'ingestion de nitrates, les répercussions seraient plus marquées chez des sujets présentant une pathologie gastro-intestinale. C'est pourquoi nous avons utilisé un modèle de gastrite expérimentale induite chez le rat.

Chez le rat sain anesthésié la présence de nitrates dans l'estomac réduisait la sensibilité douloureuse à sa distension. Cet effet mettait en jeu la production de monoxyde d'azote (NO) à partir de la réduction des nitrates. En ce qui concerne l'inflammation gastrique, l'ingestion de nitrates atténuait significativement la réponse inflammatoire, à des doses que l'on peut retrouver dans une alimentation normale. Cet effet "protecteur" vis-à-vis de la muqueuse gastrique fait également intervenir une production de NO.

Dans les conditions expérimentales de cette étude, l'ingestion de nitrates ou de nitrites, à des doses susceptibles d'être présentes dans l'alimentation normale de l'homme, induit des altérations fonctionnelles et biochimiques de la paroi gastro-intestinale. Cependant, ces altérations peuvent être considérées comme mineures et ne semblent pas de nature à favoriser l'apparition ultérieure de pathologies digestives. Au contraire, certains effets bénéfiques de l'ingestion de nitrates ont été trouvés au niveau gastrique : réduction de la sensibilité douloureuse à la distension et réduction de l'intensité d'une gastrite expérimentale. Ces effets impliquent le monoxyde d'azote produit par la réduction des nitrates.

Publications issues de ce projet

Larauche M, Anton PM, Garcia-Villar R, Theodorou V, Frexinós J, Bueno L, et al. Protective effect of dietary nitrate on experimental gastritis in rats. *Br J Nutr* 2003;89(6):777-86.

Larauche M, Bueno L, Fioramonti J. Effect of dietary nitric oxide on gastric mucosal mast cells in absence or presence of an experimental gastritis in rats. *Life Sci* 2003;73(12):1505-16.

Influence de la complexation par le RG-II des fruits et légumes sur l'absorption et la rétention des éléments toxiques (Pb, Ba et Sr) chez le rat

Charles Coudray et al., 1998

Le plomb est une des substances chimiques dont la présence dans les aliments est préoccupante pour la santé humaine. Sa toxicité fait l'objet de nombreuses recherches épidémiologiques et expérimentales. Un travail préalable a été déjà réalisé pour évaluer l'exposition des personnes au Pb alimentaire en déterminant sa teneur dans le vin et les jus de fruits. Il importait de préciser son degré d'assimilation par l'organisme.

Les fruits et légumes, en particulier le vin, contiennent un polysaccharide pectique naturel qui est un complexant spécifique du plomb. Cette substance, le rhamnogalacturonane II (RG-II), appartient au groupe des fibres alimentaires et est donc non dégradé dans l'intestin mais fermenté dans le colon. L'objectif principal de ce projet est de déterminer si le Pb des fruits et légumes complexé par le RG-II est moins disponible à l'absorption intestinale et donc moins dangereux que d'autres formes de Pb.

Nous avons mené plusieurs études expérimentales chez l'animal pour vérifier cette hypothèse. Dans un premier temps, nous avons vérifié que le RG-II est bien une fibre fermentescible qui donc peut larguer ses métaux dans le colon après fermentation. Nous avons ensuite comparé la biodisponibilité du Pb lié au RG-II à celle de l'acétate de Pb, nos résultats ont confirmé la moindre biodisponibilité du Pb dans le complexe Pb-RG-II par rapport au Pb de l'acétate.

La deuxième étude avait pour objectif de déterminer l'effet de l'administration, chez le rat, de RG-II sur l'absorption du Pb déjà accumulé dans l'organisme, pour ce faire nous avons mené deux approches complémentaires. La première consistait à charger l'organisme en Pb par voie orale, puis de traiter l'animal par le RG-II pour éliminer ce Pb. Dans la deuxième

approche du Pb était administré par voie intra-péritonéale et du RG-II par voie orale. Dans les deux études nous avons dosé le Pb dans les fèces, les urines et dans les tissus.

Les résultats des deux études montrent clairement que le RG-II ne pourrait pas contribuer à l'élimination du Pb déjà accumulé dans l'organisme et ne peut donc pas jouer un rôle dans le traitement de saturnisme. Seule une utilisation préventive pourrait être envisagée, néanmoins d'autres études restent encore nécessaires pour déterminer les conditions optimales dans lesquelles le RG-II peut être utile pour diminuer l'absorption du Pb.

Publications issues de ce projet

Tahiri M, Pellerin P, Tressol JC, Doco T, Pepin D, Rayssiguier Y, Coudray C. The rhamnogalacturonan-II dimer decreases intestinal absorption and tissue accumulation of lead in rats. *J Nutr* 2000;130(2):249-53.

Tahiri M, Tressol JC, Doco T, Rayssiguier Y, Coudray C. Chronic oral administration of rhamnogalacturonan-II dimer, a pectic polysaccharide, failed to accelerate body lead detoxification after chronic lead exposure in rats. *Br J Nutr* 2002;87(1):47-54.

Transport du cadmium alimentaire : mécanismes et régulations

Martine Kolf-Clauw et al., 1998

Polluant métallique bioaccumable (absorbé puis accumulé dans l'organisme), le cadmium contamine les chaînes alimentaires à partir des sols agricoles. Chez l'Homme adulte non fumeur et non exposé professionnellement, l'alimentation représente la source majeure de contamination par le cadmium. La compréhension des mécanismes d'absorption du cadmium administré de façon prolongée est essentielle, ainsi que l'identification de cibles cellulaires au niveau digestif.

Les objectifs de ce projet sont donc de préciser les mécanismes impliqués dans l'absorption digestive du cadmium, dans son accumulation rénale, ainsi que les facteurs modulant ces mécanismes. Ces travaux sont nécessaires au développement rationnel de prévention et de traitement lors de l'exposition prolongée au cadmium.

Dans la première phase du projet ont été étudiés le transport trans-épithélial et l'accumulation du cadmium sur deux lignées cellulaires d'origine humaine. L'absorption digestive du cadmium a montré trois étapes distinctes, dans les deux modèles cellulaires. Le métal s'accumule encore dans le compartiment cellulaire sans saturation au bout de 72 heures d'exposition. Les cellules exposées de façon chronique accumulent plus de cadmium que les cellules exposées une fois, et transfèrent aussi plus de cadmium au pôle basal de la cellule, ce qui mime l'absorption digestive. Le modèle cellulaire a permis de mettre en évidence l'intervention de protéines distinctes dans l'absorption digestive du cadmium, et de proposer un gène candidat, le gène N-Ramp2 comme transporteur probable, intervenant dans la seconde phase. Ces résultats ont permis de conclure que le cadmium est capturé par transport actif et par diffusion, et qu'il s'accumule aussi longtemps que les métallothionéines (protéines de transport) sont synthétisées, sans seuil de saturation à 72 heures. Aussi, la toxicité du cadmium alimentaire pourrait dépendre de l'activité du transporteur d'une part et du contenu cellulaire en métallothionéines d'autre part.

Dans la seconde phase du projet nous avons utilisé le modèle des cellules humaines intestinales Caco-2 pour analyser l'induction de la protéine N-ramp2 après exposition répétée au cadmium, et mettre en évidence des cibles cellulaires intervenant dans l'absorption de xénobiotiques.

Les conséquences de l'exposition prolongée au cadmium sur une cible membranaire de premier intérêt, la P-glycoprotéine digestive, ont été analysées. Les résultats de cette étude montrent que l'exposition chronique de cellules Caco-2 au cadmium entraîne une augmentation de l'activité de cette protéine. Par ailleurs cette augmentation observée est dépendante de la dose utilisée.

Notre travail suggère que l'exposition répétée au Cd par voie alimentaire entraîne une augmentation de l'activité de la P-gp. Cette induction peut avoir des conséquences physiologiques et pharmacologiques dans les domaines nutritionnels et thérapeutiques. Les effets de l'exposition prolongée au cadmium alimentaire sur le transporteur membranaire et/ou la P-glycoprotéine digestive sont en cours d'investigation sur un modèle vivo, utilisant des jeunes rats traités 13 semaines par voie alimentaire.

D'un point de vue santé publique, nos travaux mettent en évidence la capacité «d'adaptation» de cellules digestives exposées de façon chronique à des doses non cytotoxiques de cadmium. Cette propriété est à considérer dans l'évaluation des risques pour l'Homme exposé par voie alimentaire.

Publications issues de ce projet

Blais A, Lecoœur S, Milhaud G, Tome D, Kolf-Clauw M. Cadmium uptake and transepithelial transport in control and long-term exposed Caco-2 cells: the role of metallothionein. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999;160(1):76-85.

Lecoœur S, Huynh-Delerme C, Blais A, Duche A, Tome D, Kolf-Clauw M. Implication of distinct proteins in cadmium uptake and transport by intestinal cells HT-29. *Cell Biol Toxicol* 2002;18(6):409-23.

3 Microbiologie

Etude de la prévalence de la résistance aux antibiotiques des bactéries colonisant l'homme au contact ou non avec les élevages porcins en France en 2000

Antoine Andremont et al., 1999

Le phénomène de résistance aux antibiotiques des bactéries pathogènes, source de nombreuses infections humaines, augmente régulièrement et pose de graves problèmes thérapeutiques. La consommation des antibiotiques, particulièrement élevée en France, est la principale cause de l'augmentation observée de la résistance bactérienne. Les bactéries normales, commensales, que nous portons tous dans notre gorge, notre tube digestif ou sur notre peau, et avec lesquelles nous vivons en parfaite intelligence, sont aussi de plus en plus résistantes. Ces bactéries résistantes aux antibiotiques mais non pathogènes pour l'homme constituent un problème de santé publique potentiel car elles peuvent transmettre cette résistance à des espèces bactériennes pathogènes ou provoquer des infections chez les sujets immunodéprimés.

La transmission de bactéries résistantes des animaux d'élevage, qui reçoivent de nombreux traitements antibiotiques (à des fins prophylactiques et thérapeutiques ou comme promoteurs de croissance), vers le personnel en charge de ces élevages, a été décrite. La présente étude avait pour objet l'évaluation, chez les porchers, du rôle de l'environnement professionnel dans le développement de la résistance bactérienne au sein des diverses flores commensales.

Cette étude a été réalisée en comparant les flores commensales d'éleveurs de porc à celles de sujets contrôles de même âge, de même sexe, vivant dans le même canton mais n'ayant pas de contact professionnel ou personnel avec les élevages de porcs.

Les résultats ont montré que les éleveurs étaient significativement plus porteurs de bactéries commensales résistantes dans leur gorge, leur nez et leur tube digestif. Ces bactéries commensales ne représentent pas un risque majeur d'infection, tant que le porteur est par ailleurs en bonne santé. Néanmoins ces résultats doivent inciter à développer des mesures de protection de l'éleveur durant le déroulement de son activité afin de permettre de diminuer cette colonisation particulière qui concourt à la dissémination de la résistance bactérienne chez l'homme.

L'évaluation de la colonisation des flores commensales par des bactéries pathogènes chez les personnels soignants à l'hôpital fait actuellement l'objet d'un projet complémentaire soutenu dans le cadre du programme Environnement & Santé.

Publications issues de ce projet

Aubry-Damon H, Andremont A, Lienard M, Delzescaux D. Etude de prévalence de la résistance aux antibiotiques des bactéries colonisant l'homme en contact ou non avec les élevages de porc en France en 2000. Paris: Inserm, FNCSV, MSA, InVS; 2002 march 2002.

Aubry-Damon H, Grenet K, Sall-Ndiaye P, Che D, Cordeiro E, Bounoux ME, et al. Antimicrobial resistance in commensal flora of pig farmers. *Emerg Infect Dis* 2004;10(5):873-9.

Circulation du virus Puumala, prédiction et prévention de la FHSR (fièvre hémorragique avec syndrome rénal, infection à virus Puumala, Hantavirus, Bunyaviridae)

Florence Cliquet et al., 1999

Résumé non communiqué. Pprojet brièvement mentionné dans la mise en perspective du thème Microbiologie

Métabolisme hépatique de composés peptidiques ou pseudopeptidiques produits par des micro-organismes : mécanismes de protection ou d'intoxication

Marcel Delaforge et al., 1999

L'homme puise largement dans le monde animal et végétal pour se procurer des composés nécessaires à sa survie mais aussi pour remédier à certaines défaillances. C'est ainsi que la majorité des médicaments sont issus de produits formés par des micro-organismes et des

plantes. Ces mêmes micro-organismes sont aussi capables de produire des produits toxiques pour l'homme : les mycotoxines.

Les systèmes de défense des organismes supérieurs face à ces mycotoxines impliquent des équipements enzymatiques susceptibles de transformer rapidement ces composés et de les évacuer de l'organisme. C'est ainsi que des enzymes du métabolisme localisées essentiellement au niveau du foie, les cytochromes P450, sont capables de transformer et d'éliminer en quelques minutes des composés tels que la cyclosporine, médicament d'origine fongique et utilisé dans le cas de greffes d'organe. Toutefois, dans un certain nombre de cas, ces enzymes du métabolisme génèrent des métabolites plus réactifs et nocifs que les composés parentaux causant par là-même l'apparition de manifestations toxiques indirectes : dénaturation des parois cellulaires, des enzymes ou du matériel génétique pouvant provoquer des cancers. C'est le cas de l'aflatoxine, composé hépatocarcinogène produit sur des arachides avariées. Ce projet a porté sur la reconnaissance et le métabolisme de quelques mycotoxines par les cytochromes P450. En effet, les mécanismes moléculaires des effets de ces mycotoxines ne sont pas connus. Certains de ces composés, ou produits de leur dégradation, du fait de leur composition, sont difficiles à distinguer de ceux de l'organisme. Il convenait de développer une méthodologie adaptée.

Nous avons, pour cela, développé des méthodes adaptées à la préparation de mycotoxines légèrement modifiées au niveau de leur poids (contenant des isotopes stables, non radioactifs) mais strictement identiques aux produits naturels que ce soit au niveau de leur structure chimique, de leur réactivité et de leurs effets biologiques.

Ces mycotoxines modifiées permettent de mieux appréhender les paramètres pharmacologiques de ces composés dans des systèmes modèles mais aussi in vivo chez l'homme : absorption, transport, métabolisme, élimination. Ces techniques sont extrapolables à la préparation de tous les produits issus des biotechnologies.

Cette technique a permis dans le cadre de ce projet de préciser le métabolisme de plusieurs composés toxiques pour l'homme ou l'animal :

● **La roquefortine**, mycotoxine produite dans les ensilages et responsable d'intoxication du bétail. Ce composé s'avère être un inhibiteur puissant du fonctionnement des cytochromes P450 hépatiques. Cependant par isomérisation photoinduite d'une double liaison, il est transformé en isoroquefortine, composé moins toxique et aisément transformé. Ceci constitue un mode original de détoxification de dérivés de type imidazole (responsables d'inhibitions de nombreuses métallo-enzymes) par modification structurale à la lumière.

● **La tentoxine** est un phytotoxique spécifique qui bloque la production énergétique de certaines plantes et les font ainsi mourir. Le métabolite majoritaire identifié et isolé est une carbinolamine R-N-CH₂OH, métabolite considéré comme instable pour de nombreux médicaments. Il s'avère cependant que ce complexe peut exister dans de nombreux cas mais que sa détection est rendue impossible par les techniques analytiques utilisées. De plus nous avons reprecisé le mode d'action phyto-toxique de ce composé et démontré que cette toxicité proviendrait d'une différence du niveau d'activité métabolique entre plantes sensibles et résistantes.

● **La phenylahistine** est une mycotoxine qui fait l'objet d'un intérêt particulier en raison de ses propriétés anti-tumorales. Nous avons montré qu'elle était rapidement métabolisée et que ses métabolites ne possédaient plus d'activité cytotoxique. En collaboration avec une équipe japonaise, nos informations structurales permettent d'élaborer des molécules dont l'activité anti-tumorale s'avère plus importante.

Des études similaires sur des mélanges de mycotoxines sont actuellement poursuivies dans le cadre du programme Environnement & Santé 2002. L'ensemble de ces travaux contribue directement à l'amélioration des connaissances sur les mécanismes moléculaires d'intoxication.

Publications issues de ce projet

Loiseau N, Gomis JM, Santolini J, Delaforge M, Andre F. Predicting the conformational states of cyclic tetrapeptides. *Biopolymers* 2003;69(3):363-85.

Minoletti C, Santolini J, Haraux F, Pothier J, Andre F. Rebuilt 3D structure of the chloroplast f1 ATPase-tentoxin complex. *Proteins* 2002;49(3):302-20.

Garrigues A, Loiseau N, Delaforge M, Ferte J, Garrigos M, Andre F, et al. Characterization of two pharmacophores on the multidrug transporter P-glycoprotein. *Mol Pharmacol* 2002;62(6):1288-98.

Aninat C, Hayashi Y, Andre F, Delaforge M. Molecular requirements for inhibition of cytochrome p450 activities by roquefortine. *Chem Res Toxicol* 2001;14(9):1259-65.

Delaforge M, Bouille G, Jaouen M, Jankowski CK, Lamouroux C, Bensoussan C. Recognition and oxidative metabolism of cyclodipeptides by hepatic cytochrome P450. *Peptides* 2001;22(4):557-65.

Facteurs de risques de survenue des syndromes hémolytiques et urémiques (SHU) par infection à *E. Coli* producteurs de vérotoxines (VTEC) chez l'enfant de moins de 15 ans en France

Jean-Claude Desenclos et al., 1999

Le syndrome hémolytique et urémique (SHU), majoritairement lié à des infections bactériennes à *Escherichia coli* producteurs de shiga-toxine (STEC), est la principale cause d'insuffisance rénale aiguë chez l'enfant de moins de 3 ans. En France, presque tous les SHU sont sporadiques. En l'absence de traitement spécifique des SHU et des infections à STEC, il est important d'identifier les facteurs de risque de survenue de ces infections, afin d'élaborer et de mettre en œuvre des mesures de prévention et de contrôle adaptées. Une étude cas-témoins nationale a donc été conduite en 2000 et 2001 afin d'identifier les facteurs de risque des SHU sporadiques chez les enfants de moins de 15 ans.

Cent-cinq cas de SHU typiques (avec diarrhée prodromique) identifiés par le réseau de néphrologues pédiatres participant à la surveillance du SHU, ont été comparés à 196 témoins appariés sur l'âge, le sexe et le lieu de domicile et sélectionnés par le médecin traitant du cas. Pour 61 cas, une infection à STEC a été confirmée par recherche des anticorps dirigés contre un lipopolysaccharide bactérien de 26 sérogroupes de STEC. Les cas et les témoins ont été interrogés par téléphone avec un questionnaire standardisé recueillant des informations socio-démographiques et cliniques et les expositions (alimentaires, hydriques, animales, environnementales et humaines) pendant la période des sept jours précédant la date de la diarrhée du cas. Des analyses ont été conduites sur l'ensemble des SHU et sur les SHU confirmés à STEC. Des analyses stratifiées par âge et par saison (période mai-septembre et octobre-avril) ont été réalisées.

L'existence de cas de diarrhée dans la famille, dans la collectivité fréquentée par le cas, la consommation de steak haché peu cuit et la consommation d'eau de puits étaient statistiquement associées à la survenue d'un SHU typique, lorsque ces différents critères étaient pris en compte séparément. L'association avec la consommation d'eau de puits était plus forte pendant la période mai-septembre. Pendant cette même période, les contacts avec des bovins étaient également associés à la survenue d'un SHU confirmé à STEC.

Si on prend en compte simultanément ces différents critères la survenue d'un SHU typique est associée à la consommation de steak haché peu cuit, à l'existence de cas de diarrhée dans la collectivité et à l'existence de cas de diarrhée dans la famille, l'influence des autres facteurs n'étant plus significatives.

Nos résultats indiquent que la consommation de steak haché peu cuit et la transmission interhumaine dans la famille ou dans la collectivité sont les principaux facteurs de risque de survenue des SHU liés à une infection à STEC chez les enfants de moins de 15 ans en France.

Afin de sécuriser la consommation de viande hachée de bœuf, notamment pour les consommateurs les plus susceptibles (jeunes enfants, personnes âgées et malades), une réflexion doit être menée autour de l'analyse et la gestion de ce risque. Des mesures doivent être appliquées à tous les niveaux, de la production à la consommation. Les mesures d'hygiène classique doivent être rappelées et mises en œuvre rapidement en cas de survenue de cas de diarrhée dans une collectivité ou dans la famille. Le contact des jeunes enfants avec des bovins ou leur fumier doit être évité, ainsi que la consommation d'eau de puits ou de source privée non traitée.

Publications issues de ce projet

Vaillant V, Espié E. Facteurs de risque de survenue des syndromes hémolytiques et urémiques liés à une infection à *Escherichia Coli* producteurs de shiga-toxine chez les enfants de moins de 15 ans en France: INVS; 2002 Juin 2002.

Escherichia coli producteurs de vérotoxines d'origine environnementale et impliqués en clinique humaine : analyse comparative permettant d'établir les caractéristiques liées au pouvoir pathogène de ces bactéries responsables d'intoxications alimentaires

Christian Forestier et al., 1998

Le projet avait pour objectif principal de définir les caractéristiques spécifiques de certaines souches bactériennes d'*Escherichia coli* pathogènes pour l'homme. Le pouvoir pathogène de ces bactéries est principalement lié à la production de toxines appelées vérotoxines, mais d'autres facteurs bactériens interviennent vraisemblablement et sont présents uniquement dans les souches pathogènes. La contamination de l'homme s'effectue par voie orale à partir de l'environnement où ces souches sont abondantes.

Les travaux proposés se répartissaient en trois étapes :

1. réalisation d'une collection de souches bactériennes à partir d'échantillons de selles de bovins, de produits alimentaires et de selles humaines ;
2. détermination des caractéristiques des bactéries ;
3. comparaison moléculaire et analyse statistique des résultats.

Pendant une période de 12 mois, la recherche de bactéries a été réalisée sur 2143 échantillons d'origine différente et récoltés tout au long de l'année. Cette recherche a nécessité la mise au point préalable de tests moléculaires permettant l'identification de souches exprimant les vérotoxines à partir de l'échantillon incubé quelques heures en milieu de culture. La présence de bactéries potentiellement productrices de vérotoxines a ainsi été mise en évidence dans 70% des selles de bovins, 10,5 % des aliments et 3 % des selles d'enfants. L'analyse de la répartition des prélèvements positifs en fonction du temps a permis de mettre en évidence un pic saisonnier (mois d'août) de présence de ces pathogènes, mais uniquement dans les selles de bovins et les produits alimentaires. La caractérisation génétique de ces bactéries a permis d'identifier 220 souches de bactéries productrices de vérotoxine.

Parallèlement à la détermination des caractéristiques génétiques des vérotoxines, l'analyse des profils biochimique et de résistance aux antibiotiques a été réalisée. Cette analyse a été complétée par la détermination des sérogroupes et sérotypes - caractéristiques immunologiques - en collaboration avec le centre international de l'OMS, Copenhague. Les souches se répartissent en 8 profils biochimiques et les isolats issus des prélèvements animaux présentent une plus grande sensibilité aux antibiotiques. Six groupes sérologiques prédominent et aucun d'entre eux n'a été associé à des cas cliniques humains.

Une analyse moléculaire comparative a ensuite été entreprise afin de déterminer les caractéristiques propres aux souches pathogènes pour l'homme. Dans une première étape, 22 souches isolées de l'environnement et 3 souches isolées à partir de cas cliniques ont été comparées. Les taux de similarité observés entre les deux groupes de souches varient entre 63,6 et 88 %, indiquant ainsi que les souches pathogènes pour l'homme proviennent vraisemblablement de l'environnement.

L'étape suivante a consisté à rechercher les séquences d'ADN propres aux souches pathogènes, en comparant une souche pathogène avec une souche de même sérotype isolée de l'environnement. 32 fragments d'ADN spécifiques ont ainsi été mis en évidence chez la souche pathogène. Leur analyse a permis de déterminer qu'il s'agissait d'éléments d'ADN mobiles.

Ces résultats renforcent l'hypothèse selon laquelle les souches pathogènes ont évolué à partir de souches de l'environnement via l'acquisition de fragments d'ADN associés à des fonctions de virulence. Cette étude a également permis de déterminer la prévalence de ces pathogènes potentiels dans l'environnement, ce qui représente une donnée originale en France, où aucune analyse de ce type n'avait été réalisée.

Publications issues de ce projet

Pradel N, Livrelli V, De Champs C, Palcoux JB, Reynaud A, Scheutz F, et al. Prevalence and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle, food, and children during a one-year prospective study in France. *J Clin Microbiol* 2000;38(3):1023-31.

Pradel N, De Champs C, Palcoux JB, Sirot J, Forestier C, Joly B, et al. Iverotoxin-producing *Escherichia coli* infections: study of its prevalence in children in the Auvergne region. *Arch Pediatr* 2000;7 Suppl 3:544s-550s.

Bertin Y, Boukhors K, Pradel N, Livrelli V, Martin C. Stx2 subtyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle in France: detection of a new Stx2 subtype and correlation with additional virulence factors. *J Clin Microbiol* 2001;39(9):3060-5.

Pradel N, Boukhors K, Bertin Y, Forestier C, Martin C, Livrelli V. Heterogeneity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from hemolytic-uremic syndrome patients, cattle, and food samples in central France. *Appl Environ Microbiol* 2001;67(6):2460-8.

Pradel N, Leroy-Setrin S, Joly B, Livrelli V. Genomic subtraction to identify and characterize sequences of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O91:H21. *Appl Environ Microbiol* 2002;68(5):2316-25.

Plasticité du génome des micro-organismes et environnement : mutateurs comme facteurs de risque pour l'apparition et la transmission de la résistance aux antibiotiques

Yvan Matic et al., 1997

L'émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques constitue un problème de santé publique important. La survenue de mutations dans le génome de ces bactéries induit de la variabilité génétique (ou plasticité du génome) leur permettant d'acquérir ces nouvelles caractéristiques. Ce projet avait pour objet l'étude de l'influence des perturbations de l'environnement sur le contrôle moléculaire de cette variabilité génétique. Une meilleure connaissance de ces mécanismes peut permettre de développer de nouvelles stratégies assurant un meilleur contrôle de l'émergence et de la dissémination des résistances aux antibiotiques.

Il est apparu au cours de ces travaux que la connaissance du taux de mutation d'une population bactérienne est un excellent indicateur de l'efficacité du traitement antibiotique. En d'autres termes, une antibiothérapie sélectionne simultanément des bactéries résistantes et des bactéries présentant des taux de mutation importants. En conséquence, la mise en évidence, lors d'une épidémie, du caractère mutateur d'une souche bactérienne conduit à redoubler de vigilance. Cette bactérie étant plus apte à évoluer, elle déjouera plus facilement les traitements ce qui augmentera sa capacité à coloniser des réservoirs à partir desquels l'épidémie pourrait éventuellement repartir.

Ces considérations sont également à prendre en compte dans le cas d'infections nosocomiales. Enfin, chez des sujets à risques (immunodéprimés, femmes enceintes...), la présence de bactéries mutatrices dans la population commensale (population naturelle de l'organisme) ou dans l'environnement doit conduire à une stratégie de prévention adaptée.

En conclusion, l'augmentation du taux de la mutagenèse en conditions de stress (ici une antibiothérapie) confère à la bactérie des capacités rapides d'adaptation. Cependant, il reste à répondre à une importante question : les mutations induites dans les conditions de stress sont-elles seulement les sous-produits tolérés de la réparation nécessaire pour la survie dans un environnement défavorable, ou la sélection naturelle a-t-elle favorisé l'évolution des systèmes mutateurs inductibles parce que la mutagenèse accrue peut augmenter la probabilité de la survie dans ces conditions.

Publications issues de ce projet

Tenaillon O, Le Nagard H, Godelle B, Taddei F. Mutators and sex in bacteria: conflict between adaptive strategies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(19):10465-70.

Matic I, Taddei F, Radman M. No genetic barriers between *Salmonella enterica* serovar typhimurium and *Escherichia coli* in SOS-induced mismatch repair-deficient cells. *J Bacteriol* 2000;182(20):5922-4.

Denamur E, Lecointre G, Darlu P, Tenaillon O, Acquaviva C, Sayada C, et al. Evolutionary implications of the frequent horizontal transfer of mismatch repair genes. *Cell* 2000;103(5):711-21.

Tenaillon O, Taddei F, Radman M, Matic I. Second-order selection in bacterial evolution: selection acting on mutation and recombination rates in the course of adaptation. *Res Microbiol* 2001;152(1):11-6.

Giraud A, Matic I, Tenaillon O, Clara A, Radman M, Fons M, et al. Costs and benefits of high mutation rates: adaptive evolution of bacteria in the mouse gut. *Science* 2001;291(5513):2606-8.

Giraud A, Radman M, Matic I, Taddei F. The rise and fall of mutator bacteria. *Curr Opin Microbiol* 2001;4(5):582-5.

Matic I, Tenaillon O, Lecointre G, Darlu P, Radman M, Taddei F, Denamur E.

Horizontal transfer of mismatch repair genes and the variable speed of bacterial evolution. In: Syvanen MaK, C.I., editor. *Horizontal gene transfer*. 2nd Edition ed. London: Academic Press Inc; 2002. p. 147-155.

Denamur E, Bonacorsi S, Giraud A, Duriez P, Hilali F, Amorin C, et al. High frequency of mutator strains among human uropathogenic *Escherichia coli* isolates. *J Bacteriol* 2002;184(2):605-9.

Giraud A, Matic I, Radman M, Fons M, Taddei F. Mutator bacteria as a risk factor in treatment of infectious diseases. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46(3):863-5.

Dionisio F, Matic I, Radman M, Rodrigues OR, Taddei F. Plasmids spread very fast in heterogeneous bacterial communities. *Genetics* 2002;162(4):1525-32.

Matic I, Babic A, Radman M. 2-aminopurine allows interspecies recombination by a reversible inactivation of the *Escherichia coli* mismatch repair system. *J Bacteriol* 2003;185(4):1459-61.

Bjedov I, Lecointre G, Tenaillon O, Vaury C, Radman M, Taddei F, et al. Polymorphism of genes encoding SOS polymerases in natural populations of *Escherichia coli*. *DNA Repair (Amst)* 2003;2(4):417-26.

4 Neurotoxiques

Etude comportementale et neurochimique du potentiel neurotoxique du toluène à faible concentration et du bruit lors d'une exposition simultanée à long terme : analyse de la part respective du toluène et du bruit et influence du genre

Jacques Abraini et al., 2000

Les solvants organiques à des concentrations relativement élevées présentent un risque pour la santé, en particulier pour le système nerveux (risque neurotoxique) et les fonctions sensorielles telle que l'audition (risque ototoxique). Bien que les risques potentiels pour la santé engendrés par les faibles concentrations de solvants organiques soient actuellement mal établis, leur rôle dans l'apparition du syndrome des bâtiments malsains est souvent avancé. Parmi les solvants organiques, nombreux sont ceux, tels que le toluène et/ou le styrène, qui sont facilement accessibles au public et qui sont susceptibles d'être libérés de façon continue à de faibles concentrations dans l'air intérieur des bâtiments de travail et d'habitation. Par ailleurs, plusieurs solvants organiques entrent dans la composition des matériaux de second œuvre dont le vieillissement est mal connu, des bâtiments d'habitation et de bureaux, par exemple, en tant que diluants pour les peintures ou comme composants de certaines matières plastiques (bac à douche, évier, etc.). Par conséquent, la meilleure appréciation des risques liés, d'une part, aux solvants organiques à faible concentration et, d'autre part, à l'exposition simultanée à d'autres nuisances connues pour potentialiser les effets toxiques des solvants organiques revêt donc une importance particulière en matière de santé publique.

Nous avons étudié en laboratoire chez le rongeur le potentiel neurotoxique sur les fonctions d'exploration, les fonctions motrices et les fonctions posturales de l'exposition semi-chronique d'une concentration de toluène jusqu'alors considéré comme subtoxique. Cette étude a été complétée par la recherche d'une éventuelle sensibilisation des animaux exposés au toluène à faible concentration aux effets hypnotiques du toluène à forte concentration. Des rongeurs mâles et femelles ont été exposés soit au toluène, soit à un bruit, soit co-exposés au toluène et au bruit pendant 4 mois (16 semaines) à raison de 104 heures par semaine.

Les résultats obtenus sur le plan comportemental et neurochimique ont été comparés à ceux d'animaux contrôles du même âge exposés à un flux d'air propre en place et lieu de toluène. Sur le plan comportemental, nos résultats montrent, quel que soit le genre des animaux, mâles ou femelles, que les animaux exposés au toluène ont une activité d'exploration moins importante que celle des animaux contrôles. Au contraire, aucun effet significatif du toluène n'a été trouvé sur l'activité locomotrice et posturale. On note par ailleurs, quel que soit le genre des animaux, une plus grande sensibilité aux effets narcotiques du toluène à forte concentration chez les animaux exposés au toluène. Sur le plan neurochimique, le tableau observé est moins cohérent et l'on observe peu d'effets sur les systèmes neurochimiques étudiés ce qui exclut une interprétation directe de cause à effet entre modifications neurochimiques et altérations comportementales. Cependant, des études complémentaires que nous avons réalisées ont montré que l'exposition au toluène à faible concentration engendre des modifications significatives des systèmes neurochimiques dans diverses structures cérébrales impliquées dans le contrôle des fonctions végétatives, telles que la respiration. Contrairement au toluène, l'exposition des animaux mâles et femelles à un bruit n'a montré aucun effet sur le plan comportemental et neurochimique. Par ailleurs, la co-exposition au toluène et au bruit a produit des altérations comportementales et neurochimiques similaires à celles engendrées par le toluène seul, suggérant que les effets observés lors de la co-exposition au toluène et au bruit sont imputables à l'action du toluène seul.

En conclusion, cette étude a permis de montrer, pour la première fois, que l'exposition semi-chronique au toluène à une concentration de 40 ppm jusqu'alors considérée comme subtoxique (dans des études de courte durée), est susceptible de produire des troubles comportementaux et de sensibiliser aux effets narcotiques aigus du toluène à forte concentration. Ainsi, au delà de l'exposition à des concentrations élevées ou potentiellement élevées de toluène dans le cadre de pratiques addictives ou professionnelles, l'exposition à des très faibles concentrations de toluène par exemple au sein des bâtiments d'habitation ou de travail, se révèle au regard de notre étude susceptible d'effets délétères. Ainsi, dans une perspective de santé publique, l'estimation du potentiel toxique du toluène (et des autres solvants organiques) devrait conduire à reconsidérer les études uniquement basées sur la concentration de solvant, et à développer des recherches prenant en compte non seulement la concentration d'exposition mais également la durée et la fréquence d'exposition, ainsi que les multiples possibilités de co-exposition à plusieurs solvants et/ou à d'autres substances tels que par exemple l'alcool et les substances illicites pouvant conduire à une sensibilisation croisée entre produits et à une potentialisation de leurs effets délétères.

Publications issues de ce projet

Berenguer P, Soulage C, Perrin D, Pequignot JM, Abraini JH. Behavioral and neurochemical effects induced by subchronic exposure to 40 ppm toluene in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2003;74(4):997-1003. Berenguer P, Soulage C, Fautrel A, Pequignot JM, Abraini JH. Behavioral and neurochemical effects induced by subchronic combined exposure to toluene at 40 ppm and noise at 80 dB-A in rats. *Physiol Behav* 2004;81(3):527-34.

Soulage C, Perrin D, Berenguer P, Pequignot JM. Sub-chronic exposure to toluene at 40 ppm alters the monoamine biosynthesis rate in discrete brain areas. *Toxicology* 2004;196(1-2):21-30.

**Etude des troubles neurocomportementaux
en lien avec une exposition prolongée aux pesticides :
suivi à 4 ans des sujets de l'étude Phytoner**
Patrick Brochard, Isabelle Baldi et al., 1997 et 2000

Les effets sur la santé des expositions chroniques à des doses modérées mais répétées de pesticides sont peu connus bien qu'elles concernent un nombre élevé de sujets (entre 700 000 et 1 million en France). Des arguments existent principalement en faveur de risques cancérigènes (en particulier hématologiques), de troubles de la reproduction (infertilité, avortements, malformations, mort-nés) et de risques neurologiques périphériques (neuropathies) ou centraux (maladie de Parkinson, troubles neuro-comportementaux).

L'étude PHYTONER, initiée en 1997 en Gironde, est une enquête épidémiologique qui a pour objectif de rechercher un lien entre l'exposition prolongée aux pesticides et la survenue de troubles neuro-comportementaux chez des ouvriers viticoles. Les conditions de réalisation de cette étude permettent d'observer les effets des produits phytosanitaires dans leurs conditions habituelles d'utilisation en milieu professionnel.

Ce projet s'appuie sur une mesure précise de l'exposition aux pesticides et sur la passation de tests neurocomportementaux validés. La première phase de l'étude, achevée en 1999 (programme Environnement & Santé, 1997) a mis en évidence un lien entre l'exposition à ces produits et l'altération des fonctions les plus fines de la cognition qui permettent l'intégration de l'information (attention, conceptualisation et mémoire contrôlée). Les résultats de cette première phase posent en particulier la question de l'histoire naturelle des troubles observés : les altérations des fonctions cognitives sont-elles stables, peuvent-elles régresser avec le temps ou au contraire évoluer vers des altérations plus sévères telles que la maladie d'Alzheimer ?

Afin de répondre à cette question, un suivi à quatre ans de cette population a été mené et s'est achevé à la fin de l'année 2003. Il vise à étudier l'évolution des fonctions cognitives observées en 1997-1998. La population d'étude est la même que lors de la phase initiale : 917 sujets se répartissant en 528 sujets directement exposés, 173 sujets indirectement exposés et 216 sujets non exposés. La procédure de recueil de l'information s'appuie sur l'expérience acquise lors du suivi initial : visite au domicile par une enquêtrice psychologue et passation d'une batterie de tests validés.

Des analyses statistiques multivariées prenant en compte les facteurs de confusion potentiels sont encourus et permettront de comparer les résultats obtenus à l'inclusion et au suivi à quatre ans. De plus, l'évolution des fonctions cognitives au cours des quatre années pourra être comparée chez les sujets exposés et chez les sujets non exposés. Parallèlement, des outils de mesure de l'exposition aux pesticides sont spécifiquement développés, permettant d'une part une quantification de l'exposition cumulée au cours de la vie (projet PESTEXPO) et d'autre part une reconstitution de l'historique d'utilisation des produits (projet PESTIMAT).

Cette étude apportera des connaissances scientifiques importantes en matière de risques neurologiques liés à l'utilisation prolongée de pesticides. Elle permettra également d'orienter des mesures de prévention en milieu professionnel.

Publications issues de ce projet

Baldi I, Filleul L, Mohammed-Brahim B, Fabrigoule C, Dartigues JF, Schwall S, et al. Neuropsychologic effects of long-term exposure to pesticides: results from the French PHYTONER study. *Environ Health Perspect* 2001;109(8):839-44.

Bouillard-Dalbos B, Baldi I, Filleul L, Mohammed-Brahim B, Schwall S, Drevet JP, et al. Exposition professionnelle aux pesticides et troubles psychiatriques. *Arch Mal Prof* 2001;62:22-29.

**Exposition aux produits phytosanitaires et interactions
gène-environnement dans la maladie de Parkinson :
étude cas-témoin parmi des sujets affiliés à la Mutualité sociale agricole**
Christophe Tzourio et al., 1998

La maladie de Parkinson est, après la maladie d'Alzheimer, la plus fréquente des maladies neurodégénératives du sujet âgé. La cause de la maladie de Parkinson n'est pas connue, mais les résultats d'études récentes sont en faveur d'une origine multifactorielle, impliquant des facteurs environnementaux et une susceptibilité génétique.

Parmi les facteurs de risque environnementaux incriminés dans la maladie de Parkinson, l'exposition aux pesticides est l'un de ceux pour lequel les études sont les plus concordantes.

Au Canada et en Californie, des études épidémiologiques ont montré que la fréquence la maladie de Parkinson est plus élevée dans les régions à forte densité agricole et importantes utilisatrices de pesticides. D'autres études ont montré que, dans de nombreux pays, la vie en milieu rural, la consommation d'eau de puits, le métier d'agriculteur ou l'exposition aux pesticides sont plus fréquents chez des sujets atteints de maladie de Parkinson que chez des sujets indemnes de maladie de Parkinson (sujets contrôles). Des expériences en laboratoire chez la souris ou sur des cultures cellulaires apportent également des arguments en faveur d'un effet neurotoxique des pesticides sur les cellules qui sont touchées par la maladie.

L'évaluation de l'exposition aux pesticides est toutefois particulièrement complexe et pose des problèmes méthodologiques qui, même s'ils sont loin d'être négligeables, ont été peu ou pas abordés dans les études réalisées jusqu'à présent. C'est pourquoi nous avons réalisé une étude épidémiologique parmi les sujets affiliés à la Mutualité sociale agricole, en France. Ces sujets ont pour caractéristique d'avoir été souvent exposés à un grand nombre de pesticides différents.

L'objectif de notre étude est d'étudier en détail les caractéristiques de l'exposition aux pesticides tout au long de la vie de sujets atteints de maladie de Parkinson et affiliés à cet organisme et de les comparer aux caractéristiques de l'exposition de sujets indemnes de cette maladie et affiliés au même organisme. Nous avons également pour objectif d'étudier si le terrain génétique, en particulier des facteurs intervenant dans l'élimination des toxiques environnementaux, peut être impliqué, par exemple en favorisant une susceptibilité particulière à l'effet des pesticides (interaction gène-environnement).

Afin d'atteindre ces objectifs, nous avons recruté, entre 1998 et 2000, 247 patients touchés par la maladie de Parkinson et 676 sujets contrôles. Il s'agit en conséquence de l'une de plus grandes études réalisées dans le monde sur ce sujet. Les participants à l'étude ont été interrogés de manière approfondie par les médecins du travail de la Mutualité sociale agricole et de nombreux renseignements, concernant le type de produits pesticides utilisés, les années d'utilisation, le nombre d'heures et la fréquence annuelle d'utilisation, ou encore leur cible, ont été collectés. Ces investigations ont été complétées par des informations concernant la consommation de tabac des personnes exposées.

Nous retrouvons une association entre la maladie de Parkinson et le métier d'agriculteur ou l'exposition professionnelle aux pesticides. Concernant la consommation de tabac nous avons montré qu'il existait une association inverse entre la maladie de Parkinson et le tabagisme, cette association n'est pas modifiée par l'exposition aux pesticides. Nous avons confirmé une association entre la maladie de Parkinson et la détection chez les patients de formes variables de gènes impliqués dans la détoxification de substances toxiques ou dans des processus neurodégénératifs.

La méthode d'évaluation de l'exposition individuelle développée dans ce projet a permis le recueil de données détaillées sur l'exposition passée. Ces données sont en cours d'analyse et vont permettre d'étudier des paramètres plus précis d'exposition (rôle des familles de produits, relations dose-effet, délai entre exposition et émergence de la maladie, définition d'index d'exposition) et contribuer à préciser les déterminants de cette maladie.

Publications issues de ce projet

Elbaz A, Levecque C, Clavel J, Vidal JS, Richard F, Correze JR, et al. S18Y polymorphism in the UCH-L1 gene and Parkinson's disease: evidence for an age-dependent relationship. *Mov Disord* 2003;18(2):130-7.

Levecque C, Elbaz A, Clavel J, Richard F, Vidal JS, Amouyel P, et al. Association between Parkinson's disease and polymorphisms in the nNOS and iNOS genes in a community-based case-control study. *Hum Mol Genet* 2003;12(1):79-86.

Levecque C, Elbaz A, Clavel J, Vidal JS, Amouyel P, Alperovitch A, et al. Association of polymorphisms in the Tau and Saitohin genes with Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004;75(3):478-80.

Elbaz A, Levecque C, Clavel J, Vidal JS, Richard F, Amouyel P, et al. CYP2D6 polymorphism, pesticide exposure, and Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2004;55(3):430-4.

Maraganore DM, Lesnick TG, Elbaz A, Chartier-Harlin MC, Gasser T, Kruger R, et al. UCHL1 is a Parkinson's disease susceptibility gene. *Ann Neurol* 2004;55(4):512-21.

Elbaz A, Levecque C, Clavel J, Vidal JS, Richard F, Corrèze JR, Delemotte B, Amouyel P, Alperovitch A, Chartier-Harlin MC, Tzourio C. S18Y polymorphism in the UCH-L1 gene and Parkinson's disease: evidence for an age-dependent relation. *Mov Disord* 2003;18:137.

5 Métaux : toxicité, exposition et prévention

Induction de désordres immunopathologiques par HgCl₂ : définition des conditions, des mécanismes, de la cible moléculaire et de facteurs de susceptibilité

Lucette Pelletier, Philippe Druet et al., 1997

Les sels de mercure, qui sont un polluant de l'environnement, sont non seulement toxiques pour le rein et le système nerveux à fortes doses, mais encore ils peuvent induire des désordres immunologiques chez des sujets prédisposés à doses non toxiques. Ainsi, certains sujets développent des glomérulopathies immunes. Ce projet avait trois objectifs :

1. Tester la capacité de faibles doses de HgCl₂ à induire des désordres immunitaires à long terme.
2. Comprendre les mécanismes pour mettre au point des tests prédictifs, identifier les voies de signalisation et les cibles du HgCl₂.
3. Identifier les gènes de susceptibilité chez le rat, à terme chez l'homme.

Un modèle expérimental de rats a été développé. Les rats Brown-Norway (BN) injectés avec HgCl₂ développent une glomérulopathie immune alors que les rats Lewis (LEW) sont résistants. La maladie du rat BN est due à l'émergence de lymphocytes T (LT) auto-réactifs producteurs d'interleukine (IL)-4.

Nous avons étudié pendant 1 an, 1 fois par semaine, les paramètres de l'auto-immunité induite par HgCl₂ en recherchant la concentration sérique d'immunoglobulines (Ig)E et IgG1 et la production d'auto-anticorps (ac) dirigés contre le rein. Classiquement, la maladie est induite en 15 jours chez les rats BN injectés avec HgCl₂ 100 µg / 100 g poids, 3 fois/semaine avec retour à la normale en 6 semaines. Des doses beaucoup plus faibles d'HgCl₂ (2,5-5 µg/100 g poids, n'induisent pas de maladie cliniquement évidente mais causent une augmentation chronique de la concentration des IgE (5 à 20 fois la normale), la production d'auto-ac dirigés contre des structures rénales.

En étudiant le mode d'action d'HgCl₂, nous avons découvert une voie de signalisation originale activée uniquement dans les LT producteurs d'IL-4. En particulier, des canaux calciques sensibles à la dihydropyridine sont exprimés par ces LT et une entrée de calcium via ces canaux est nécessaire pour la production d'IL-4. HgCl₂ active tous les LT aussi bien de la souche susceptible que de la souche résistante, mais seuls les LT de rats BN produisent de l'IL-4. Ceci est probablement dû au fait que le rat BN est génétiquement programmé pour produire de l'IL-4 quel que soit le stimulus. Donc l'activation des LT par HgCl₂ ne ferait que démasquer un programme de différenciation déjà enclenché.

Ces conclusions sont soutenues par les résultats de l'analyse génétique qui a permis d'identifier 3 régions sur les chromosomes 9, 10 et 20 du rat. Il est notable que ces régions contrôlent d'autres traits de la réponse immunitaire : susceptibilité à la toxoplasmose, résistance à développer une autre maladie auto-immune : l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (modèle expérimental de sclérose en plaques).

Au total, cette étude montre que des doses d'HgCl₂ administrées de façon chronique, incapables d'induire une maladie clinique évidente, peuvent néanmoins altérer la réponse immunitaire chez des sujets génétiquement prédisposés. Par ailleurs, l'identification d'une nouvelle voie de signalisation impliquée exclusivement dans la production d'IL-4 devrait permettre de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le traitement de maladies comme l'asthme allergique.

Publications issues de ce projet

Cautain B, Damoiseaux J, Bernard I, Xystrakis E, Fournie E, van Breda Vriesman P, et al. The CD8 T cell compartment plays a dominant role in the deficiency of Brown-Norway rats to mount a proper type 1 immune response. *J Immunol* 2002;168(1):162-70

Savignac M, Badou A, Moreau M, Leclerc C, Guery JC, Paulet P, et al. Protein kinase C-mediated calcium entry dependent upon dihydropyridine sensitive channels: a T cell receptor-coupled signaling pathway involved in IL-4 synthesis. *Faseb J* 2001;15(9):1577-9.

Savignac M, Badou A, Delmas C, Subra JF, De Cramer S, Paulet P, et al. Gold is a T cell polyclonal activator in BN and LEW rats but favors IL-4 expression only in autoimmune prone BN rats. *Eur J Immunol* 2001;31(8):2266-76.

Badou A, Savignac M, Moreau M, Leclerc C, Foucras G, Cassar G, et al. Weak TCR stimulation induces a calcium signal that triggers IL-4 synthesis, stronger TCR stimulation induces MAP kinases that control IFN-gamma production. *Eur J Immunol* 2001;31(8):2487-96.

Mas M, Subra JF, Lagrange D, Pilipenko-Appolinaire S, Kermarrec N, Gauguier D, et al. Rat chromosome 9 bears a major susceptibility locus for IgE response. *Eur J Immunol* 2000;30(6):1698-705.

Fournie GJ, Cautain B, Xystrakis E, Damoiseaux J, Mas M, Lagrange D, et al. Cellular and genetic factors involved in the difference between Brown Norway and Lewis rats to develop respectively type-2 and type-1 immune-mediated diseases. *Immunol Rev* 2001;184:145-60.

Fournie GJ, Mas M, Cautain B, Savignac M, Subra JF, Pelletier L, et al. Induction of autoimmunity through bystander effects. Lessons from immunological disorders induced by heavy metals. *J Autoimmun* 2001;16(3):319-26.

Evolution de l'imprégnation de la population française vis-à-vis du cadmium, du mercure et du plomb

Guy Huel et al., 1999

Une évaluation de l'évolution de l'imprégnation par le mercure et le cadmium au sein de 2 régions françaises, la Bretagne et la Lorraine a été réalisée au sein d'une population de jeunes hommes. Ce travail permet de faire deux constats. D'abord concernant l'évolution de l'imprégnation, on observe assez clairement l'absence de variation des caractéristiques moyennes des teneurs en cadmium aussi bien en Bretagne qu'en Lorraine. Au contraire l'imprégnation par le mercure est plus préoccupante. Une augmentation sensible et statistiquement significative de l'imprégnation est observée au sein des deux régions. Cette observation pourrait témoigner du retard de la France vis-à-vis de l'éradication de ce métal, comme en témoigne la condamnation de notre pays par la Cour de justice de l'Union Européenne en 1997. Nos résultats traduisent l'urgente nécessité, qu'il y avait en 1995, de prendre les mesures d'éradication, mesures qui ne furent prises que récemment. Ces mesures réglementaires visant la réduction du mercure dans l'environnement en France étant très récentes, elles n'auront vraisemblablement un impact sur l'imprégnation humaine que dans quelques années compte tenu le caractère cumulatif du mercure.

Par ailleurs, des variations inter-régionales ont été également estimées : région Poitou-Charente, PACA et DOM-TOM. Concernant ces variations inter-régionales, il convient de noter l'importante relative de l'imprégnation de l'échantillon des jeunes hommes résidant en Provence-Alpes Côte d'Azur vis-à-vis du cadmium. Cette observation corrobore le fait que cette région présente, vis-à-vis des métaux lourds, un taux élevé d'émissions atmosphériques et de rejets dans l'eau. Les Départements d'Outre-mer présentent aussi une légère surexposition, comparativement aux régions métropolitaines. Ce fait est similaire à celui observé à propos du risque saturnin dans ces départements. Ce travail confirme l'observation faite en 1982 d'une légère surimprégnation mercurielle des populations vivant à toute proximité du littoral, aussi bien atlantique que méditerranéen. Cette surimprégnation relative au mercure des populations côtières peut s'expliquer par une consommation plus élevée des produits marins. On connaît, en effet, les risques de contamination de la chaîne alimentaire.

En résumé, à propos des variations de l'imprégnation entre 1982 et 1995, les conclusions s'opposent selon le métal considéré : amélioration de la situation en ce qui concerne le cadmium, accentuation de l'imprégnation en ce qui concerne le mercure. Diverses variations interrégionales peuvent être constatées à propos de l'imprégnation des populations vis-à-vis du cadmium et du mercure. Comme, il l'a été constaté déjà lors de la surveillance de la population française vis-à-vis du risque saturnin, il semble que, s'il fallait hiérarchiser le risque selon la région, l'imprégnation des populations des DOM-TOM paraît plus préoccupante que celle des populations d'origine métropolitaine.

Détermination de l'altération de la fonction rénale chez le rat exposé de façon chronique et aiguë aux métaux lourds et mise au point de tests de toxicité sur des cellules rénales en culture primaire

Philippe Poujeol et al., 1996-2000

Les métaux lourds toxiques (cadmium, chrome, plomb, cobalt, nickel, mercure) sont très présents dans notre environnement. Parmi ces métaux, le cadmium (Cd) constitue l'un des plus dangereux. Un des principaux organes cibles de la toxicité du cadmium est le rein : il est maintenant bien établi que le cadmium est responsable à moyen et long termes de néphropathies graves se traduisant par des insuffisances rénales (Syndrome de Fanconi).

La toxicité des métaux lourds intervient à des doses extrêmement faibles et il est important d'en connaître le métabolisme dans l'organisme pour pouvoir traiter un jour efficacement les personnes intoxiquées. Pour ces raisons, l'étude des relations entre le rein et le cadmium constitue un enjeu majeur en terme de santé publique.

L'objectif de nos travaux est d'étudier les mécanismes intervenant dans la réabsorption et la toxicité rénale et de définir

l'effet de ces métaux lourds sur la fonction rénale lors d'intoxications aiguës ou chroniques du cadmium. Pour cela nous avons utilisé des techniques in vitro de culture cellulaire et mis au point in vivo des nanotechniques d'exploration fonctionnelle du rein chez le rat.

Nos travaux nous ont permis de démontrer l'extraordinaire et inquiétante capacité du rein à réabsorber les métaux lourds comme le cadmium. Ceci indique que l'organisme n'est pas capable d'éliminer ces métaux par la voie urinaire, qui pourtant constitue l'unique voie naturelle d'élimination des toxiques. Ce phénomène se traduit par une accumulation rapide au niveau des organes cibles comme le rein et le foie qui va entraîner une dégénérescence des cellules et de graves pathologies.

La fixation très rapide du cadmium dans le foie et les reins pose un autre problème du point de vue médical : l'absence de trace de cadmium dans le plasma et l'urine entraîne l'impossibilité d'établir un diagnostic précoce ou de détecter une éventuelle exposition à ce toxique. Nous avons aussi pu mettre en évidence qu'une exposition au cadmium, même à très faible dose, n'est jamais anodine et que cette faible exposition si elle est prolongée peut avoir des conséquences importantes sur la fonction rénale et sur la santé en général. De plus, de graves insuffisances rénales peuvent apparaître longtemps après la fin de l'intoxication et cela alors que rien auparavant ne pouvait le laisser prévoir : cet effet toxique "retard" est dramatique.

Au cours de nos travaux, nous avons aussi cherché le moyen d'augmenter l'excrétion urinaire du cadmium. Comme nous l'avons dit précédemment, l'élimination urinaire constitue l'unique façon de diminuer l'accumulation du cadmium dans l'organisme. Nous avons pu identifier et démontrer l'efficacité de différentes substances :

- La D-cystéine, un acide-aminé de synthèse non réabsorbé par l'épithélium rénal et capable de fixer la forme libre et toxique du cadmium (Cd²⁺).
- Les métaux divalents comme le fer (Fe²⁺), le cobalt (Co²⁺) et le zinc (Zn²⁺) capables de rentrer en compétition avec les transporteurs rénaux du cadmium.
- Le bumétanide, un diurétique, capable de diminuer le transport paracellulaire des ions chargés positivement.

Parallèlement, nous avons mis en évidence que le zinc (Zn²⁺), un oligo-élément essentiel, est capable de protéger la fonction rénale de l'individu intoxiqué par le cadmium lorsqu'il est administré préventivement.

Tous ces résultats sont encourageants puisqu'ils montrent, in vivo, qu'il est possible de diminuer l'accumulation du cadmium dans l'organisme et d'empêcher la survenue des pathologies lors d'une intoxication chronique au cadmium.

Aucune exposition au cadmium n'est sans effet sur l'organisme, les seuils d'exposition tolérables sont sans doute encore actuellement surestimés. Par ailleurs, le diagnostic de l'intoxication s'avère difficile avant l'apparition des premiers symptômes d'insuffisance rénale. Toutefois, l'espoir de protéger l'organisme des effets toxiques du cadmium reste présent avec la mise en évidence d'outils pharmacologique tels que le zinc, le fer, la D-Cystéine ou le bumétanide.

Publications issues de ce projet

Ducoudret O, Barbier O, Tauc M, Fuchs M, Poujeol P. Characterization of Zn(2+) transport in Madin-Darby canine kidney cells. *Biochim Biophys Acta* 2003;1611(1-2):171-9.

Barbier O, Jacquillet G, Tauc M, Poujeol P, Cougnon M. Acute Study of Interaction between Cadmium, Calcium and Zinc Transport Along the Rat Nephron in Vivo. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004: sous presse.

5 Gestion et perception du risque

Diminution du risque d'intoxication saturnine des enfants

par réduction de la présence de plomb dans l'habitat ancien :

évaluation des procédures intégrées dans les interventions classiques de réhabilitation

Luc Ginot et al., 1999

Un ensemble de chantiers réalisés sur le territoire d'Aubervilliers (93), dans l'habitat ancien contaminé par le plomb a été suivi à la fois en ce qui concerne la valeur du plomb en poussières et celle des plombémies des enfants concernés par ces chantiers. Il s'agissait de mesurer l'efficacité de ces chantiers en terme de réduction de la contamination environnementale, et de mesurer la fréquence des aggravations secondaires intervenant éventuellement après ces travaux. Une attention particulière était portée au contexte juridique du chantier (de

droit commun, encadré réglementairement, ou chantier de substitution lié à la loi de 1998 sur les exclusions), et aux mesures de mise en sécurité des enfants durant les travaux.

Les résultats montrent que les chantiers s'accompagnent d'une réduction des contaminations de l'environnement plus fréquemment que d'aggravation, à court comme à long terme. Les aggravations secondaires des plombémies des enfants sont rares, mais existent. Elles semblent plus fréquentes dans le cadre des chantiers démarrant après mise en demeure, mais avant substitution. Ces aggravations secondaires peuvent se retrouver aussi bien pour des chantiers en parties communes que privatifs, pour des travaux de faible envergure ou spécifiques au plomb comme pour des travaux de rénovation plus vastes. L'éloignement de jour des enfants ne semble pas les protéger totalement du risque d'aggravation secondaire. L'imputabilité de ces aggravations aux travaux, comme leur explication par des manquements aux règles de précaution, ou d'autres facteurs (chantiers secondaires, etc...), doit être discutée de façon prudente.

Cependant, on peut penser : (a) que les travaux de rénovation ou de traitement du plomb conduisent à une diminution de l'exposition et à un nombre faible d'aggravations secondaires, et qu'ainsi les mesures contenues dans la loi de 1998 devraient être appliquées de façon plus large, et (b) que les travaux, qu'ils soient spécifiques au plomb ou de rénovation, doivent s'accompagner d'une plus grande rigueur dans la mise en sécurité des enfants, y compris pour des chantiers en parties communes ou des chantiers de faible ampleur.

Publications issues de ce projet

Conférence de consensus «Intoxication par le plomb de l'enfant et de la femme enceinte», Lille, 5-6 novembre 2003 (publication en cours dans la revue «Santé Publique»)

Perceptions et représentations des risques en relation avec les zoonoses liées à l'alimentation et à l'environnement Dominique Jacques-Jouvenot et al., 2000

La contribution sociologique à la réflexion portant sur les maladies en relation avec l'environnement, et en particulier les zoonoses, est importante pour comprendre les mécanismes sociaux relatifs à ces maladies. En effet, les récents événements médiatiques (listériose, vache folle...) ont montré que les réactions du public ne correspondaient pas forcément à des comportements rationnels et n'étaient donc pas explicables par les seuls risques objectifs.

Les zoonoses ont la particularité d'intégrer des variables aussi complexes que les modifications environnementales, des modifications écologiques, des paramètres immuno-génétiques et les comportements humains. Les actions de gestion du risque (modifications environnementales volontaristes au plan collectif, changement de pratiques à risque au plan individuel) ne peuvent s'imposer que si elles trouvent un écho dans la population visée.

L'objectif de cette étude est d'analyser les pratiques et les représentations des risques pour la santé en relation avec l'alimentation, les contacts avec les animaux, les contacts avec la nature, en prenant pour modèle une zoonose parasitaire, l'échinococcose alvéolaire, maladie rare mais sévère, dont l'épidémiologie semble actuellement en train de se modifier (extension vers les zones urbaines, rôle des animaux domestiques).

L'étude repose sur une centaine d'entretiens semi-directifs menés en Franche-Comté, – région particulièrement touchée par la maladie – auprès de populations urbaines et rurales, échantillonnées en fonction de leurs relations de proximité avec la nature, de leur situation de consommateur exclusif ou de producteur/consommateur, et de leur résidence située ou non dans les zones d'hyperendémie pour la maladie prise comme modèle.

Une description des pratiques et des représentations ainsi qu'une analyse de ces pratiques et représentations dans leurs dimensions synchroniques et diachroniques constituent le corps du rapport.

Cette étude permet, en dehors d'une meilleure compréhension de l'épidémiologie de l'échinococcose alvéolaire, une connaissance raisonnée des comportements et attitudes des populations vis-à-vis des risques pour la santé susceptible d'améliorer la communication sur ces risques et de faciliter la gestion de ces risques par les pouvoirs publics.

Analyse coût-bénéfice des politiques de la lutte contre la pollution : Validation d'outils à partir du cas de la pollution particulière de l'air en Ile-de-France Ari Rabl et al., 1996

L'objectif de ce projet est d'explorer la possibilité d'effectuer des analyses coût-bénéfice (ACB) dans le domaine de la lutte contre la pollution de l'air. Deux bases de connaissances sont utilisées pour la quantification des impacts des particules sur la santé : l'étude ERPURS [1994] en Ile-de-France et le projet ExternE (« External Costs of Energy ») de la Commission européenne (CE). Le passage émission-immission est analysé avec les modèles de dispersion atmosphérique du projet ExternE.

Les coûts économiques sont évalués en appliquant les résultats de plusieurs études récentes en France. La principale lacune dans l'évaluation des bénéfices a été le manque de données en France sur le consentement à payer (CAP) des individus pour éviter une détérioration de leur état de santé du fait de la pollution de l'air. Afin de combler cette lacune, un des objectifs du projet présent est de développer et tester un questionnaire d'évaluation contingente. En fait, deux versions complémentaires du questionnaire ont été développées, une pour la population générale, l'autre pour des personnes souffrant d'affections respiratoires, administrée à l'hôpital Rothschild à Paris.

Les résultats de ces enquêtes sont résumés ici et intégrés dans l'analyse coût-bénéfice. Il s'avère que les coûts liés aux effets aigus de la pollution (tels qu'identifiés par l'étude ERPURS) sont négligeables comparés aux effets chroniques, surtout la mortalité dite chronique selon la fonction dose-réponse. Les composantes principales du bénéfice d'une amélioration de la qualité de l'air sont :

1. une augmentation de l'espérance de vie, évaluée ici en prenant la valeur statistique (ou valeur de référence) de la vie humaine de 5,5 MF (millions de francs, soit environ 838 470 €) estimée pour la France ;
2. une diminution du coût économique des affections respiratoires ;
3. une amélioration du bien-être général de la population mesurée par le consentement à payer des individus pour une meilleure qualité de l'air. Nous proposons d'agrèger ces trois valeurs pour obtenir une estimation du bénéfice social lié à une amélioration de la qualité de l'air.

L'analyse coût-bénéfice est appliquée à la nouvelle réglementation proposée pour les incinérateurs de déchets et au programme AutoOil concernant les technologies de réduction des émissions de particules par les véhicules diesel. Pour les incinérateurs, la nouvelle réglementation serait préférable dans la mesure où le surcoût de dépollution est à peu près compensé par le bénéfice social. Quant aux particules émises par les véhicules diesel, les investissements de dépollution proposés pour les voitures privées et les autobus diesel par le programme AutoOil [1996] de la CE sont largement justifiés dans les grandes agglomérations.

Publications issues de ce projet

- Rabl A. Les bénéfices monétaires d'une amélioration de la qualité de l'air en Ile-de-France. *Pollution Atmosphérique* 1999;161:83-84.
- Funk K, Rabl A. Electric versus conventional vehicles. *Transportation Research. part D : Transport and Environment* 1999;4(6):397-411.
- Rabl A, Spadaro J.V. Environmental damages and costs : an analysis of uncertainties. *Environnement International* 1999;25(1):29-46.
- Rabl A, Funk K. Electrical versus conventional vehicles : social costs and benefits in France. *Transportation Research* 1999.
- Rabl A, Spadaro J.V. Health costs of automobile pollution. *Rev Franç Allergol Immunol Clin* 2000;40(1):55-59.
- Leksell I, Rabl A. Air pollution and mortality: quantification and valuation of years of life lost. *Risk Anal* 2001;21(5):843-57.

Santé, environnement et consommation alimentaire

Pierre Rainelli et al., 1999

Cette étude visait à évaluer en terme monétaire les bénéfices associés à l'amélioration de la qualité sanitaire de l'eau et des aliments.

Les diverses contaminations d'aliments par des bactéries, la dioxine, ou l'agent de l'ESB (encéphalite spongiforme bovine) ont conduit à la perte de confiance du public dans les aliments et dans les systèmes de production agricoles. En raison d'un niveau d'éducation et d'information plus élevé et des préoccupations croissantes du public en matière de santé, on note un processus d'amplification sociale.

Le même phénomène est perceptible avec les OGM.

Lorsque de telles crises éclatent on observe un effondrement de la consommation du produit incriminé. Ainsi le fait qu'un possible lien entre l'ESB et la maladie de Creutzfeldt-Jacob puisse exister a entraîné une chute de la consommation de viande bovine. Dans le même ordre d'idée la possibilité que les nitrates dans l'eau puissent avoir des effets sur la santé humaine (cancers de l'estomac) a conduit à un accroissement de la consommation d'eau en bouteille. L'inquiétude du public quant aux OGM est un facteur d'explication des achats de produits issus de l'agriculture biologique.

Ce comportement des consommateurs peut s'analyser comme un processus d'arbitrage entre le bien "santé" et d'autres biens économiques. En se situant dans le cadre de

l'économie du ménage, on a un individu qui en combinant son temps et des biens achetés, comme des médicaments ou des aliments, produit le bien "santé". Ce cadre permet de déterminer ce qu'une personne est prête à payer pour bénéficier d'une amélioration de sa santé, ou d'une baisse des risques affectant sa santé. Cette approche, appelée aussi "dépenses de protection" est utilisée à propos de la présence de nitrates dans l'eau du robinet. En comparant les dépenses d'eau en bouteille des gens habitant en montagne, où l'eau est de meilleure qualité, avec les dépenses des habitants des plaines, le consentement à payer pour éviter l'absorption de nitrates a été évalué à 6 € par ménage et par an.

La présence d'OGM dans l'alimentation inquiète beaucoup de consommateurs en Europe, ainsi que les risques environnementaux liés à la culture des plantes transgéniques. Les craintes des habitants des Etats-Unis, où 63 % des surfaces en soja et 24 % des surfaces en maïs sont en OGM en 2001, sont moindres. Toutefois l'importance croissante d'une demande extérieure et intérieure de produits certifiés exempts d'OGM encourage une démarche d'étiquetage volontaire. Cela ressort des débats publics organisés par la Food and Drug Administration (FDA, USA).

Pour ce qui est des produits issus de l'agriculture biologique la question de fond est le motif pour lequel les gens achètent ces produits : santé, protection de l'environnement, goût... ? Il semble que ce soit surtout les qualités intrinsèques qui jouent. Les résultats obtenus à partir des achats dans les supermarchés montrent la grande sensibilité aux prix de ces produits compte tenu de la forte substituabilité avec les aliments conventionnels. Ainsi, la part des produits biologiques dans les achats de steak haché atteint seulement 3 %, mais le consentement à payer (CAP) pour avoir du steak haché « bio » est de 40 %.

La perception par les consommateurs du risque de contamination des aliments par le biais des métaux lourds provenant des boues d'épandage a été estimée. Il s'agit simplement de la perception car il est impossible d'établir une relation dose-réponse. Une évaluation contingente a été menée auprès de 830 consommateurs pour des pommes, du pain, et des pommes de terre. Il apparaît que les individus attachent plus d'importance à la sécurité alimentaire dans le cas des fruits et légumes. Mais les individus ne sont pas prêts à payer un supplément de prix pour des produits à teneur en métaux lourds contrôlée.

Publications issues de ce projet

- Armand-Balmat C. Comportement du consommateur et produits biologiques : le consentement à payer pour la caractéristique biologique. *REP* 2002;112(1):33-63.
- Carpentier A. Valuation of non-market goods using microdata on markets good demands. In: *Contingent valuation methods*; 2003 23-24 juin; Marseille: IDEP- GREQAM; 2003.
- Carpentier A., Vermersch D. Measuring willingness to pay for drinking water quality using the econometrics equivalent scale. *Nota di lavoro* 92-97 FEEM -Fondazione Eni Enrico Mattei- Special Issue on Environment and Resource Economics.

Validité du cheveu en tant qu'indicateur d'imprégnation de populations enfantines vis-à-vis du risque saturnin

Pascale Tubert-Bitter et al., 1998

Les effets néfastes du plomb, chez l'être humain, sont connus depuis plusieurs siècles. Au cours des deux dernières décennies, l'accroissement des risques de pollution environnementale par le plomb suscita de légitimes inquiétudes. De multiples études épidémiologiques ont pu évaluer les effets à long terme d'une intoxication par le plomb, révélant ainsi chez les enfants de possibles séquelles neurologiques maintenant bien connues ou selon la gravité de l'intoxication, l'existence de signes de dysfonctionnement cérébral.

Ces considérations ont entraîné les autorités sanitaires des pays industrialisés vers une politique de dépistage des enfants exposés de façon anormalement élevée. La surveillance de la population infantile française a permis de mettre en évidence une zone constituée par Paris et le Val de Marne. Cette zone exhibe un taux préoccupant d'enfants (4,6 %) présentant une plombémie supérieure à 100 µg/l (PBS100), limite acceptable par les autorités sanitaires internationales.

Afin d'étudier l'intérêt du dosage du cheveu en plomb, en tant qu'outil de primo-dépistage d'enfants à risque de plombémie élevée, des échantillons de cheveux ont été prélevés chez 63 enfants âgés de 2 à 9 ans, résidant au sein de zones à risque d'exposition. Quatre procédures de discrimination ont été comparées dans le but de détecter des enfants à haut risque d'imprégnation (PBS100). Ces procédures se différencient par le nombre de mesures en plomb effectuées sur chaque enfant et la prise en compte ou non de l'âge.

Les performances respectives estimées de chacun des différents critères semblent comparables (taux d'erreur de type faux négatifs : entre 5% et 4% ; de type faux positifs : entre 16% et 25% respectivement).

Ces résultats suggèrent l'intérêt d'utiliser, en cas de suspicion de plombémies élevées, un «primo-dépistage» par cette technique qui paraît moins éprouvante pour les enfants. La faisabilité a été testée sur une population de plus d'un millier d'enfants dans un quartier parisien.

Evaluation épidémiologique des effets psychologiques des inondations de 1992 dans le Vaucluse

Pierre Verger et al., 1996

Les catastrophes environnementales peuvent entraîner des troubles psychologiques à court et à long terme au sein des populations exposées. Parmi ces troubles, l'état de stress post-traumatique (ESPT) est un trouble psychologique sévère et durable. A la suite de catastrophes naturelles, il peut atteindre 50 % des victimes.

D'autres troubles peuvent l'accompagner ou survenir de façon indépendante : il s'agit notamment de troubles anxieux et dépressifs. En France, plusieurs catastrophes naturelles sont survenues dans le passé mais il existe peu de données épidémiologiques sur leurs conséquences psychologiques. Une inondation, survenue en septembre 1992 dans le département du Vaucluse, a entraîné 38 décès et touché 63 communes. Une étude épidémiologique a été conduite en 1997 pour étudier l'impact psychologique de cette catastrophe cinq années plus tard.

Une enquête a été réalisée par téléphone à Bédarrides (5000 habitants), l'une des communes les plus touchées, auprès de ses résidents âgés de plus de 18 ans en 1992. Cinq cent personnes ont été interviewées. Cette étude a permis d'observer que pour les niveaux d'exposition à l'inondation les plus élevés, les symptômes d'ESPT étaient à la fois plus fréquents et sévères. De même, la présence de symptômes dépressifs était aussi fortement augmentée, mais uniquement chez les personnes âgées de 35 à 54 ans. L'impact psychologique des pertes matérielles était surtout observé chez les personnes ayant les plus faibles revenus. Par ailleurs, une mauvaise perception de l'état de santé, la consommation de médicaments psychotropes et le recours aux soins étaient deux fois plus fréquents en cas d'exposition sévère. Enfin, les troubles psychologiques étaient plus fréquemment observés chez les personnes ayant reçu une assistance psychologique au moment des événements, ce indépendamment du fait d'avoir été suivi pour des troubles psychologiques dans le passé.

L'inondation de 1992 à Bédarrides a pu contribuer à l'aggravation et au déclenchement de troubles psychologiques et à une consommation de soins plus importante chez les personnes les plus exposées, soit environ 20 % de la population de Bédarrides. L'étude souligne que certaines personnes sont plus vulnérables que d'autres : celles ayant été suivies pour des troubles psychologiques dans le passé, celles ayant demandé une assistance psychologique au moment de l'inondation, celles âgées entre 35 et 54 ans (probablement en raison des responsabilités pesant sur celles-ci) et celles ayant un faible niveau de revenu. Ces résultats renforcent ceux d'autres études, menées dans des pays de cultures différentes, en faveur d'un impact psychosocial des catastrophes naturelles.

La dimension psychologique devrait être mieux prise en compte lors des catastrophes naturelles. Les résultats de cette étude posent la question des modalités de prise en charge des victimes de catastrophe à long terme : quelle articulation dans la prise en charge psychologique entre le court et le long terme ? Comment faire en sorte que la gestion des conséquences de la catastrophe n'aggrave pas les vulnérabilités individuelles ; comment faire pour mobiliser efficacement et rapidement les ressources locales ou nationales, pour minimiser les coûts individuels et sociaux ?

Publications issues de ce projet

Verger P, Rotily M, Baruffol E, Boulanger N, Vial M, Sydor G, et al., *Evaluation des conséquences psychologiques des catastrophes environnementales : une étude de faisabilité à partir des inondations de 1992 dans le Vaucluse (France)*. *Santé* 1999;9,5:313-318.

Verger P, Hunault C, Rotily M, Baruffol E. colloque "Epidémiologie, Environnement et Santé, Saint-Malo, 25-27 octobre 1999". *Facteurs de variation des symptômes de stress post-traumatique cinq années après l'inondation de 1992 dans le Vaucluse*. *Revue d'épidémiologie et de santé publique* 1999;48, suppl:2S44-2S53.

Les publications issues des projets

Abboud P, Lemee V, Gargala G, Brasseur P, Ballet JJ, Borsa-Lebas F, et al. Successful treatment of metronidazole- and albendazole-resistant giardiasis with nitazoxanide in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Clin Infect Dis* 2001;32(12):1792-4.

Abrous M, Dreyfuss G, Rondelaud D. The ability of eight species of freshwater snails to sustain the larval development of *Paramphistomum daubneyi* Dinnikj, either singly or in combination with *Fasciola hepatica* Linné. *Rev Med Vet* 1999;150(8-9):727-732.

Abrous M, Rondelaud D, Dreyfuss G. Influence of low temperatures on the cercarial shedding of *Paramphistomum daubneyi* from the snail *Lymnaea truncatula*. *Parasite* 1999;6(1):85-8.

Abrous M, Rondelaud D, Dreyfuss G. Cercarial productivity of redial generations in single-miracidium infections of *Lymnaea truncatula* with *Paramphistomum daubneyi* or *Fasciola hepatica*. *J Helminthol* 2000;74(1):1-5.

Abrous M, Rondelaud D, Dreyfuss G. A field study of natural infections in three freshwater snails with *Fasciola hepatica* and/or *Paramphistomum daubneyi* in central France. *J Helminthol* 2000;74(3):189-94.

Abrous M, Rondelaud D, Dreyfuss G. The stress of *Lymnaea truncatula* just before miracidial exposure with *Fasciola hepatica* increased the prevalence of infection. *Exp Parasitol* 2001;99(1):49-51.

Abrous M, Rondelaud D, Dreyfuss G, Cabaret J. Infection of *Lymnaea truncatula* and *Lymnaea glabra* by *Fasciola hepatica* and *Paramphistomum daubneyi* in farms of central France. *Vet Res* 1999;30(1):113-8.

Abrous M, Vareille-Morel C, Rondelaud D, Dreyfuss G, Cabaret J. Metacercarial aggregation in Digenea (*Fasciola hepatica* and *Paramphistomum daubneyi*): environmental or species determinism? *J Helminthol* 2001;75(4):307-11.

Alberto F, Broussolle V, Mason DR, Carlin F, Peck MW. Variability in spore germination response by strains of proteolytic *Clostridium botulinum* types A, B and F. *Lett Appl Microbiol* 2003;36(1):41-5.

Aninat C, Hayashi Y, Andre F, Delaforge M. Molecular requirements for inhibition of cytochrome p450 activities by roquefortine. *Chem Res Toxicol* 2001;14(9):1259-65.

Annesi-Maesano I, Orszczyn MP, Moreau D, Barny S, Deniaud F, Noël M, Pierre M. Risk factors for allergic sensitisation to *Blomai Tropicalis* in adolescents in New Caledonian adolescents. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:A722.

Annesi-Maesano I, Orszczyn MP, Debotte G, Moreau D. Are all the animals equal in the Noah's ark. Risk, selection or protective effect of animal allergens in IgE-mediated allergy. ISAAC - New Caledonia. *Eur Respir J* 2001;18(suppl 33):351s.

Annesi-Maesano I, Orszczyn MP, Moreau D, Debotte G, Barny S, Deniaud F, et al. Traditional lifestyle is not related to IgE-mediated allergy in New Caledonian adolescents. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:A271.

Armand-Balmat C. Comportement du consommateur et produits biologiques : le consentement à payer pour la caractéristique biologique. *REP* 2002;112(1):33-63.

Aubry-Damon H, Andremont A, Lienard M, Delzescaux D. Etude de prévalence de la résistance aux antibiotiques des bactéries colonisant l'homme en contact ou non avec les élevages de porc en France en 2000. Paris: Inserm, FNCSBV, MSA, InVS; 2002 march 2002.

Aubry-Damon H, Grenet K, Sall-Ndiaye P, Che D, Cordeiro E, Bougnoux ME, et al. Antimicrobial resistance in commensal flora of pig farmers. *Emerg Infect Dis* 2004;10(5):873-9.

Auger J, Eustache F, Andersen AG, Irvine DS, Jorgensen N, Skakkebaek NE, et al. Sperm morphological defects related to environment, lifestyle and medical history of 1001 male partners of pregnant women from four European cities. *Hum Reprod* 2001;16(12):2710-7.

Auger J, Eustache F, Ducot B, Blandin T, Daudin M, Diaz I, et al. Intra- and inter-individual variability in human sperm concentration, motility and vitality assessment during a workshop involving ten laboratories. *Hum Reprod* 2000;15(11):2360-8.

Auger J, Jouannet P. Evidence for regional differences of semen quality among fertile French men. *Federation Francaise des Centres d'Etude et de Conservation des Oeufs et du Sperme humains. Hum Reprod* 1997;12(4):740-5.

Badou A, Savignac M, Moreau M, Leclerc C, Foucras G, Cassar G, et al. Weak TCR stimulation induces a calcium signal that triggers IL-4 synthesis, stronger TCR stimulation induces MAP kinases that control IFN-gamma production. *Eur J Immunol* 2001;31(8):2487-96.

Balaguer P, Boussioux AM, Demirpence E, Nicolas JC. Reporter cell lines are useful tools for monitoring biological activity of nuclear receptor ligands. *Luminescence* 2001;16(2):153-8.

Baldi I, Filleul L, Mohammed-Brahim B, Fabrigoule C, Dartigues JF, Schwall S, et al. Neuropsychologic effects of long-term exposure to pesticides: results from the French Phytoner study. *Environ Health Perspect* 2001;109(8):839-44.

Barbier O, Jacquillet G, Tauc M, Poujeol P, Cougnon M. Acute Study of Interaction between Cadmium, Calcium and Zinc Transport Along the Rat Nephron in Vivo. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004:sous presse.

Barouki R, Massaad C, Garlatti M. Brevet n°97 16062: INSERM; 1997 18 décembre 1997. Report No.: 97 16062.

Baysson H, Billon S, Laurier D, Rogel A, Tirmarche M. Seasonal correction factors for estimating radon exposure in dwellings in France. *Radiat Prot Dosimetry* 2003;104(3):245-52.

Bazire A, Schorvaert D, Jouannet P, Multigner L, Auger J. Caractéristiques de morphologie et de mouvements de spermatozoïdes de *Rattus rattus* provenant de trois écosystèmes guadeloupéens : impact probable des pollutions environnementales. *Andrologie* 2000;12:383-384.

Ben-Brik E, Jerome L, Arnaud I, Yous S, Labat L, Haguenoer JM, et al. Exposure to glycol ethers in a population of French men evaluated by measurement of urinary alkoxy-carboxylic acids. *Int Arch Occup Environ Health* 2004;77(5):368-72.

Bendridi N, LeJeune H, Pugeat M. La fécondité masculine serait-elle menacée par l'environnement ? Rôle potentiel des xéno-estrogènes. *Rev Franç Endocrin Clin* 1999;XL.

Bendridi N, LeJeune H, Pugeat M. Xénobiotiques et altération de la fonction de reproduction chez l'homme. *Métabolismes-Hormones-Nutrition* 2001;V(6):281-285.

Bendridi N, Mappus E, Cuilleron C, Grenot C, Pugeat M. Interaction du bisphenol A avec la sex hormone-binding globulin (SHBG) : conséquences sur sa biodisponibilité in vivo. *Ann Endocrin* 2000;4:362.

Bendridi N, Mappus E, Grenot C, Lejeune H, Yves Cuilleron C, Pugeat M. Intravenous injection of human sex steroid hormone-binding globulin in mouse decreases blood clearance rate and testicular accumulation of orally administered 12-125Iiodobisphenol A. *Steroids* 2002;67(7):637-45.

Berenguer P, Soulage C, Fautrel A, Pequignot JM, Abraini JH. Behavioral and neurochemical effects induced by subchronic combined exposure to toluene at 40 ppm and noise at 80 dB-A in rats. *Physiol Behav* 2004;81(3):527-34.

Berenguer P, Soulage C, Perrin D, Pequignot JM, Abraini JH. Behavioral and neurochemical effects induced by subchronic exposure to 40 ppm toluene in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2003;74(4):997-1003.

Bernard C, Harvey M, Briand JF, Bire R, Krysz S, Fontaine JJ. Toxicological comparison of diverse *Cylindrospermopsis raciborskii* strains: evidence of liver damage caused by a French *C. raciborskii* strain. *Environ Toxicol* 2003;18(3):176-86.

Bertin Y, Boukhors K, Pradel N, Livrelli V, Martin C. Stx2 subtyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle in France: detection of a new Stx2 subtype and correlation with additional virulence factors. *J Clin Microbiol* 2001;39(9):3060-5.

Bjedov I, Lecointre G, Tenailon O, Vaury C, Radman M, Taddei F, et al. Polymorphism of genes encoding SOS polymerases in natural populations of *Escherichia coli*. *DNA Repair (Amst)* 2003;2(4):417-26.

Blais A, Lecoquer S, Milhaud G, Tome D, Kolf-Claw M. Cadmium uptake and transepithelial transport in control and long-term exposed Caco-2 cells: the role of metallothionein. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999;160(1):76-85.

Boislevé F, Kerdine-Romer S, Rougier-Larzat N, Pallardy M. Nickel and DNCB induce CCR7 expression on human dendritic cells through different signalling pathways: role of TNF-alpha and MAPK. *J Invest Dermatol* 2004;123(3):494-502.

Boublik Y, Saint-Aguet P, Lougarre A, Arnaud M, Villatte F, Estrada-Mondaca S, et al. Acetylcholinesterase engineering for detection of insecticide residues. *Protein Eng* 2002;15(1):43-50.

Bouillard-Dalbos B, Baldi I, Filleul L, Mohammed-Brahim B, Schwall S, Drevet JP, et al. Exposition professionnelle aux pesticides et troubles psychiatriques. *Arch Mal Prof* 2001;62:22-29.

Bouillard-Dalbos B, Baldi I, Filleul L, Mohammed-Brahim B, Schwall S, JP D, et al., Exposition professionnelle aux pesticides et troubles psychiatriques. *Arch Mal Prof* 2001;62.

Brasseur P, Lemeteil D, Ballet JJ. Anti-cryptosporidial drug activity screened with an immunosuppressed rat model. *J Protozool* 1991;38(6):230S-231S.

Brasseur P, Lemeteil D, Ballet JJ. Curative and preventive anticryptosporidium activities of simefungin in an immunosuppressed adult rat model. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37(4):889-92.

Britton M. The epidemiology of mesothelioma. *Semin Oncol* 2002;29(1):18-25.

Broussolle V, Alberto F, Shearman C, Mason DR, Nguyen-the C, Peck M, et al. Molecular and physiological characterisation of spore germination in *Clostridium botulinum* and *clostridium sporogenes*. *Anaerobe* 2002;8(3):89-100.

Brugère H, Andral B, Bouvet J, Espié E, Leclerc C, Roze S, et al. Epidémiologie environnementale et alimentaire des *Escherichia coli* shiga-toxinogènes (STEC). Maisons-Alfort: AFSSA; 2003 avril 2003.

Brugère H, Andral B, Bouvet J, Espié E, Leclerc V, Roze S, et al. Epidémiologie environnementale et alimentaire des *Escherichia coli* shiga-toxinogènes.: AFSSA; 2003 Avril 2003.

Bruning T, Bolt HM. Renal toxicity and carcinogenicity of trichloroethylene: key results, mechanisms, and controversies. *Crit Rev Toxicol* 2000;30(3):253-85.

Campagna D, Huel G, Girard F, Sahuquillo J, Blot P. Environmental lead exposure and activity of delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) in maternal and cord blood. *Toxicology* 1999;134(2-3):143-52.

Campagna D, Huel G, Hellier G, Girard F, Sahuquillo J, Fagot-Campagna A, et al. Negative relationships between erythrocyte Ca-pump activity and lead levels in mothers and newborns. *Life Sci* 2000;68(2):203-15.

Carpentier A. Valuation of non-market goods using microdata on markets good demands. In: *Contingent valuation methods*; 2003 23-24 juin; Marseille: IDEP- GREQAM; 2003.

Cautain B, Damoiseaux J, Bernard I, Xystrakis E, Fournie E, van Breda Vriesman P, et al. The CD8 T cell compartment plays a dominant role in the deficiency of Brown-Norway rats to mount a proper type 1 immune response. *J Immunol* 2002;168(1):162-70.

Chaize B, Winterhalter M, Fournier D. Encapsulation of acetylcholinesterase in preformed liposomes. *Biotechniques* 2003;34(6):1158-60, 1162.

Chesnot T, Marly X, Chevalier S, Estevenon O, Bues M, Schwartzbrod J. Optimised immunofluorescence procedure for enumeration of *Cryptosporidium parvum* oocyst suspensions. *Water Res* 2002;36(13):3283-8.

Chignard M, Balloy V. Neutrophil recruitment and increased permeability during acute lung injury induced by lipopolysaccharide. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;279(6):L1083-90.

Clavel J, Goubin A, Auclerc MF, Auvrignon A, Waterkeyn C, Patte C, et al. Incidence of childhood leukaemia and non-Hodgkin's lymphoma in France: National Registry of Childhood Leukaemia and Lymphoma, 1990-1999. *Eur J Cancer Prev* 2004;13(2):97-103.

Cogne M, Basseur P, Ballet JJ. Detection and characterization of serum antitrichomonal antibodies in urogenital trichomoniasis. *J Clin Microbiol* 1985;21(4):588-92.

Colletier JP, Chaize B, Winterhalter M, Fournier D. Protein encapsulation in liposomes: efficiency depends on interactions between protein and phospholipid bilayer. *BMC Biotechnol* 2002;2(1):9.

Cordier S. Reproduction. In: Gérin M, Gosselin P, Cordier S, Viau C, Quénel P, and Dewailly E, editor. *Environnement et santé publique. Fondements et pratiques*. Montréal, Paris: edisem, Tec & Doc; 2003. p. 641-667.

Cordier S, Garel M, Mandereau L, Morcel H, Doineau P, Gosme-Seguret S, Josse D, White R, Amiel-Tison C. Neurodevelopmental investigations among methylmercury-exposed children in French Guiana. *Environ. Res.* 2002; 89 (1): 1-11

Chevrier C, Perret C, Bahuau M, Nelva A, Herman C, Francannet C, Robert Gnansia E, Cordier S. Interaction between the ADH1C polymorphism and maternal alcohol intake in the risk of nonsyndromic oral clefts : An evaluation of the contribution of child and maternal genotypes. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2004 Dec 15

Dar Y, Vignoles P, Dreyfuss G, Rondelaud D. *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*: comparative morphometric studies on the redial stage of both species. *Parasitol Res* 2003;91(5):369-73.

Dechaud H, Ravard C, Claustrat F, de la Perrière AB, Pugeat M. Xenoestrogen interaction with human sex hormone-binding globulin (hSHBG). *Steroids* 1999;64(5):328-34.

Delabre K, Zanelli F, Teulières F, Monpoeho S, Ferre V, De Roubin M. Use of a molecular method in a routine laboratory. Example of the detection of viruses from sludge samples. In: *Water Quality technology conference; 2002 10-14 novembre 2002; SEATTLE; 2002.*

Delaforge M, Bouille G, Jaouen M, Jankowski CK, Lamouroux C, Bensoussan C. Recognition and oxidative metabolism of cyclopeptides by hepatic cytochrome P450. *Peptides* 2001;22(4):557-65.

Delaunay A, Gargala G, Li X, Favennec L, Ballet JJ. Quantitative flow cytometric evaluation of maximal *Cryptosporidium parvum* oocyst infectivity in a neonate mouse model. *Appl Environ Microbiol* 2000;66(10):4315-7.

Denamur E, Bonacorsi S, Giraud A, Duriez P, Hilali F, Amorin C, et al. High frequency of mutator strains among human uropathogenic *Escherichia coli* isolates. *J Bacteriol* 2002;184(2):605-9.

Denamur E, Lecointre G, Darlu P, Tenaillon O, Acquaviva C, Sayada C, et al. Evolutionary implications of the frequent horizontal transfer of mismatch repair genes. *Cell* 2000;103(5):711-21.

Dionisio F, Matic I, Radman M, Rodrigues OR, Taddei F. Plasmids spread very fast in heterogeneous bacterial communities. *Genetics* 2002;162(4):1525-32.

Dor F, Dab W, Empereur-Bissonnet P, Zmirou D. Validity of biomarkers in environmental health studies: the case of PAHs and benzene. *Crit Rev Toxicol* 1999;29(2):129-68.

Dor F, Empereur-Bissonnet P, Zmirou D, Nedellec V, Haguenoer JM, Jongeneelen F, et al. Validation of multimedia models assessing exposure to PAHs—the SOLEX study. *Risk Anal* 2003;23(5):1047-57.

Dor F, Haguenoer JM, Zmirou D, Empereur-Bissonnet P, Jongeneelen FJ, Nedellec V, et al. Urinary 1-hydroxypyrene as a biomarker of polycyclic aromatic hydrocarbons exposure of workers on a contaminated site: influence of exposure conditions. *J Occup Environ Med* 2000;42(4):391-7.

Dor F, Jongeneelen F, Zmirou D, Empereur-Bissonnet P, Nedellec V, Haguenoer JM, et al. Feasibility of assessing dermal exposure to PAHs of workers on gaswork sites—the SOLEX study. *Sci Total Environ* 2000;263(1-3):47-55.

Dor F, Person A, Zmirou D, Empereur-Bissonnet P, Nedellec V, Haguenoer JM, et al. Personal exposure of workers to atmospheric PAHs on gasworks sites—the SOLEX study. *Appl Occup Environ Hyg* 2001;16(6):655-9.

Dreyfuss G, Abrous M, Rondelaud D. The susceptibility of *Lymnaea fuscus* to experimental infection with *Fasciola hepatica*. *J Parasitol* 2000;86(1):158-60.

Dreyfuss G, Vignoles P, Abrous M, Rondelaud D. Unusual snail species involved in the transmission of *Fasciola hepatica* in watercress beds in central France. *Parasite* 2002;9(2):113-20.

Dreyfuss G, Vignoles P, Rondelaud D. Variability of *Fasciola hepatica* infection in *Lymnaea ovata* in relation to snail population and snail age. *Parasitol Res* 2000;86(1):69-73.

Dreyfuss G, Vignoles P, Rondelaud D, Vareille-Morel C. *Fasciola hepatica*: characteristics of infection in *Lymnaea truncatula* in relation to the number of miracidia at exposure. *Exp Parasitol* 1999;92(1):19-23.

Ducoudret O, Barbier O, Tauc M, Fuchs M, Poujeol P. Characterization of Zn(2+) transport in Madin-Darby canine kidney cells. *Biochim Biophys Acta* 2003;1611(1-2):171-9.

Elbaz A, Levecque C, Clavel J, Vidal JS, Richard F, Amouyel P, et al. CYP2D6 polymorphism, pesticide exposure, and Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2004;55(3):430-4.

Elbaz A, Levecque C, Clavel J, Vidal JS, Richard F, Correze JR, et al. S18Y polymorphism in the UCH-L1 gene and Parkinson's disease: evidence for an age-dependent relationship. *Mov Disord* 2003;18(2):130-7.

Emptoz-Bonneton A, Crave JC, LeJeune H, Brebant C, Pugeat M. Corticosteroid-binding globulin synthesis regulation by cytokines and glucocorticoids in human hepatoblastoma-derived (HepG2) cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82(11):3758-62.

Eustache F, Jouannet P, Auger J. Evaluation of flow cytometric methods to measure human sperm concentration. *J Androl* 2001;22(4):558-67.

Evrard A, Hémon D, Billon S, Laurier D, Tirmarche M, Clavel J. Ecological Association between domestic radon exposure and childhood leukaemia incidence in France, 1990-1998. *Eur J Cancer Prev* sous presse.

Fach P, Perelle S, Dilasser F, Grout J, Dargaignaratz C, Botella L, et al. Detection by PCR-enzyme-linked immunosorbent assay of *Clostridium botulinum* in fish and environmental samples from a coastal area in northern France. *Appl Environ Microbiol* 2002;68(12):5870-6.

Fenet H, Gomez E, Pillon A, Rosain D, Nicolas JC, Casellas C, et al. Estrogenic activity in water and sediments of a French river: contribution of alkylphenols. *Arch Environ Contam Toxicol* 2003;44(1):1-6.

Fessard V, Bernard C. Cell alterations but no DNA strand breaks induced in vitro by cylindrospermopsin in CHO K1 cells. *Environ Toxicol* 2003;18(5):353-9.

Field AC, Bloch MF, Bellon B. Neonatal tolerance to a Th2-mediated autoimmune disease generates CD8+ Tc1 regulatory cells. *J Autoimmun* 2003;21(3):201-12.

Field AC, Caccavelli L, Bloch MF, Bellon B. Regulatory CD8+ T cells control neonatal tolerance to a Th2-mediated autoimmunity. *J Immunol* 2003;170(5):2508-15.

Field AC, Caccavelli L, Fillion J, Kuhn J, Mandet C, Bellon B. Neonatal induction and maintenance of tolerance to Th2-induced immune manifestations in rats. *Transplant Proc* 2001;33(3):2275-6.

Field AC, Caccavelli L, Fillion J, Kuhn J, Mandet C, Druet P, et al. Neonatal induction of tolerance to T(h)2-mediated autoimmunity in rats. *Int Immunol* 2000;12(10):1467-77.

Fleury-Feith J, Lecomte C, Renier A, Matrat M, Kheuang L, Abramowski V, et al. Hemizygoty of Nf2 is associated with increased susceptibility to asbestos-induced peritoneal tumours. *Oncogene* 2003;22(24):3799-805.

Fournie GJ, Cautain B, Xystrakis E, Damoiseaux J, Mas M, Lagrange D, et al. Cellular and genetic factors involved in the difference between Brown Norway and Lewis rats to develop respectively type-2 and type-1 immune-mediated diseases. *Immunol Rev* 2001;184:145-60.

Fournie GJ, Mas M, Cautain B, Savignac M, Subra JF, Pelletier L, et al. Induction of autoimmunity through bystander effects. Lessons from immunological disorders induced by heavy metals. *J Autoimmun* 2001;16(3):319-26.

Fournier S, Liguory O, Santillana-Hayat M, Guillot E, Sarfati C, Dumoutier N, et al. Detection of microsporidia in surface water: a one-year follow-up study. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2000;29(2):95-100.

Fremaux I, Mazeret S, Brisson-Lougarre A, Arnaud M, Ladurantie C, Fournier D. Improvement of *Drosophila* acetylcholinesterase stability by elimination of a free cysteine. *BMC Biochem* 2002;3(1):21.

Funk K, Rabl A. Electric versus conventional vehicles. *Transportation Research. part D : Transport and Environment* 1999;4(6):397-411.

Gargala G, Delaunay A, Favennec L, Basseur P, Ballet JJ. Enzyme immunoassay detection of *Cryptosporidium parvum* inhibition by simefungin in sporozoite infected HCT-8 enterocytic cells. *Int J Parasitol* 1999;29(5):703-9.

Gargala G, Delaunay A, Li X, Basseur P, Favennec L, Ballet JJ. Efficacy of nitazoxanide, tizoxanide and tizoxanide glucuronide against *Cryptosporidium parvum* development in sporozoite-infected HCT-8 enterocytic cells. *J Antimicrob Chemother* 2000;46(1):57-60.

- Garrigues A, Loiseau N, Delaforge M, Ferte J, Garrigos M, Andre F, et al. Characterization of two pharmacophores on the multidrug transporter P-glycoprotein. *Mol Pharmacol* 2002;62(6):1288-98.
- Geniaux G R, A. Les méthodes de quantification économiques des coûts sanitaires de la pollution atmosphérique. *Economie Publique : Etudes et Recherches*. 1998;1:161-217.
- Gerba C, Rose J, Hass C, Crabtree K. Waterborne rotavirus : a risk assessment. *Water Research* 1996;30(12):2929-2940.
- Giraud A, Matic I, Radman M, Fons M, Taddei F. Mutator bacteria as a risk factor in treatment of infectious diseases. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46(3):863-5.
- Giraud A, Matic I, Tenailon O, Clara A, Radman M, Fons M, et al. Costs and benefits of high mutation rates: adaptive evolution of bacteria in the mouse gut. *Science* 2001;291(5513):2606-8.
- Giraud A, Radman M, Matic I, Taddei F. The rise and fall of mutator bacteria. *Curr Opin Microbiol* 2001;4(5):582-5.
- Gofti L, Zmirou D, Seigle Murandi F, Hartemann P, Potelon JL. Waterborne microbiological risk assessment: a state of the art and perspectives. *Rev Epidemiol Sante Publique* 1999;47(1):61-73.
- Gofti-Laroche L, Gratacap-Cavallier B, Demanse D, Genoulaz O, Seigneurin JM, Zmirou D. Are waterborne astrovirus implicated in acute digestive morbidity (E.M.I.R.A. study)? *J Clin Virol* 2003;27(1):74-82.
- Gofti-Laroche L, Gratacap-Cavallier B, Genoulaz O, Joret JC, Hartemann P, Seigneurin JM, et al. A new analytical tool to assess health risks associated with the virological quality of drinking water (EMIRA study). *Water Sci Technol* 2001;43(12):39-48.
- Gofti-Laroche L, Joret JC, Demanse D, Zmirou D. Health risks and parasitological quality of water (E.M.I.R.A. Study). *J Am Water Works Ass* 2003;95(5):162-172.
- Gofti-Laroche L, Potelon JL, Da Silva E, Zmirou D. Description of drinking water intake in French communities (E.M.I.R.A. study). *Rev Epidemiol Sante Publique* 2001;49(5):411-22.
- Guyot R, Magre S, Leduque P, Le Magueresse-Battistoni B. Differential expression of tissue inhibitor of metalloproteinases type 1 (TIMP-1) during mouse gonad development. *Dev Dyn* 2003;227(3):357-66.
- Guyot R, Odet F, Leduque P, Forest MG, Magueresse-Battistoni BL. Diethylstilbestrol inhibits the expression of the steroidogenic acute regulatory protein in mouse fetal testis. *Mol Cell Endocrinol* 2004;220(1-2):67-75.
- Hecht SS. Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999;91(14):1194-210.
- Hot D, Legeay O, Jacques J, Gantzer C, Caudrelier Y, Guyard K, et al. Detection of somatic phages, infectious enteroviruses and enterovirus genomes as indicators of human enteric viral pollution in surface water. *Water Res* 2003;37(19):4703-10.
- Huc L, Sparfel L, Rissel M, Dimanche-Boitrel MT, Guillouzo A, Fardel O, et al. Identification of Na⁺/H⁺ exchange as a new target for toxic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Faseb J* 2004;18(2):344-6.
- Huel G, Yazbeck C, Burnel D, Missy P, Kloppmann W. Environmental boron exposure and activity of delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) in a newborn population. *Toxicol Sci* 2004;80(2):304-9.
- Ielsch G, Ferry C, Tymen G, Robe MC. Study of a predictive methodology for quantification and mapping of the radon-222 exhalation rate. *J Environ Radioact* 2002;63(1):15-33.
- Ielsch G, Thieblemont D, Labed V, Richon P, Tymen G, Ferry C, et al. Radon (222Rn) level variations on a regional scale: influence of the basement trace element (U, Th) geochemistry on radon exhalation rates. *J Environ Radioact* 2001;53(1):75-90.
- Ielsch G, Thieblemont D, Perrin J, Tymen G. Geophysical and geochemical tools for radon mapping on a regional scale. In: Union AG, editor. 1999 Fall Meeting; 1999 16 novembre 1999; 1999. p. v 51A-07.
- Jacquets S, Briand JF, Leboulanger C, Avois-Jacquet C, Oberhaus L, Tassin B, et al. The proliferation of the toxic cyanobacterium *Planktothrix rubescens* following fertilization of the largest natural french lake (lake Bourget). *Harmful algae* 2004; sous presse.
- Jensen TK, Slama R, Ducot B, Suominen J, Cawood EH, Andersen AG, et al. Regional differences in waiting time to pregnancy among fertile couples from four European cities. *Hum Reprod* 2001;16(12):2697-704.
- Jorgensen N, Andersen AG, Eustache F, Irvine DS, Suominen J, Petersen JH, et al. Regional differences in semen quality in Europe. *Hum Reprod* 2001;16(5):1012-9.
- Jourdan-Da Silva N, Perel Y, Mechinaud F, Plouvier E, Gandemer V, Lutz P, et al. Infectious diseases in the first year of life, perinatal characteristics and childhood acute leukaemia. *Br J Cancer* 2004;90(1):139-45.
- Kassa M, Comby E, Lemeteil D, Brasseur P, Ballet JJ. Characterization of anti-Cryptosporidium IgA antibodies in sera from immunocompetent individuals and HIV-infected patients. *J Protozool* 1991;38(6):179S-180S.
- Kauffmann F, Dizier MH, Annesi-Maesano I, Bousquet J, Charpin D, Demenais F, et al. EGEA (Epidemiological study on the Genetics and Environment of Asthma, bronchial hyperresponsiveness and atopy) : descriptive characteristics. *Clin Exp Allergy* 1999;29 Suppl 4:17-21.
- Kauffmann F, Dizier MH, Annesi-Maesano I, Bousquet J, Charpin D, Demenais F, et al. Epidemiological study of genetic and environmental factors in asthma, bronchial hyperresponsiveness and atopy. Protocol and potential selection bias. *Rev Epidemiol Sante Publique* 2001;49(4):343-56.
- Kauffmann F, Oryszczyn MP, Maccario J. The protective role of country living on skin prick tests, immunoglobulin E and asthma in adults from the Epidemiological study on the Genetics and Environment of Asthma, bronchial hyper-responsiveness and atopy. *Clin Exp Allergy* 2002;32(3):379-86.
- Kramarova E, Kogevinas M, Anh CT, Cau HD, Dai LC, Stellman SD, et al. Exposure to Agent Orange and occurrence of soft-tissue sarcomas or non-Hodgkin lymphomas: an ongoing study in Vietnam. *Environ Health Perspect* 1998;106 Suppl 2:671-8.
- La Scola B, Audic S, Robert C, Jungang L, de Lamballerie X, Drancourt M, et al. A giant virus in amoebae. *Science* 2003;299(5615):2033.
- La Scola B, Boyadjiev I, Greub G, Khamis A, Martin C, Raoult D. Amoeba-resisting bacteria and ventilator-associated pneumonia. *Emerg Infect Dis* 2003;9(7):815-21.
- La Scola B, Mallet MN, Grimont PA, Raoult D. Description of *Afipia birgiae* sp. nov. and *Afipia massiliensis* sp. nov. and recognition of *Afipia felis* genospecies A. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002;52(Pt 5):1773-82.
- La Scola B, Mallet MN, Grimont PA, Raoult D. *Bosea eneeae* sp. nov., *Bosea massiliensis* sp. nov. and *Bosea vestrisii* sp. nov., isolated from hospital water supplies, and emendation of the genus *Bosea* (Das et al. 1996). *Int J Syst Evol Microbiol* 2003;53(Pt 1):15-20.
- Larauche M, Anton PM, Garcia-Villar R, Theodorou V, Frexinos J, Bueno L, et al. Protective effect of dietary nitrate on experimental gastritis in rats. *Br J Nutr* 2003;89(6):777-86.
- Larauche M, Bueno L, Fioramonti J. Effect of dietary nitric oxide on gastric mucosal mast cells in absence or presence of an experimental gastritis in rats. *Life Sci* 2003;73(12):1505-16.
- Lassurguere J, Livera G, Habert R, Jegou B. Time- and dose-related effects of estradiol and diethylstilbestrol on the morphology and function of the fetal rat testis in culture. *Toxicol Sci* 2003;73(1):160-9.
- Laupeze B, Amiot L, Sparfel L, Le Ferrec E, Fauchet R, Fardel O. Polycyclic aromatic hydrocarbons affect functional differentiation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 2002;168(6):2652-8.
- Laurier D, Valenty M, Tirmarche M. Radon exposure and the risk of leukemia: a review of epidemiological studies. *Health Phys* 2001;81(3):272-88.
- Leboulanger C, Dorigo U, Jacquets S, Le Berre B, Paolini G, Humber tJF. Application of a submersible spectrofluorometer for the survey of a toxic cyanobacterial blooms : a case study. *Aquat Microbial Ecology* 2002;30(1):83-89.
- Lecoeur S, Huynh-Delerme C, Blais A, Duche A, Tome D, Kolf-Clauw M. Implication of distinct proteins in cadmium uptake and transport by intestinal cells HT-29. *Cell Biol Toxicol* 2002;18(6):409-23.
- Leksell I, Rabl A. Air pollution and mortality: quantification and valuation of years of life lost. *Risk Anal* 2001;21(5):843-57.
- Lemeu V, Zaharia I, Nevez G, Rabodonirina M, Brasseur P, Ballet JJ, et al. Metronidazole and albendazole susceptibility of 11 clinical isolates of *Giardia duodenalis* from France. *J Antimicrob Chemother* 2000;46(5):819-21.
- Lemeteil D, Roussel F, Favennec L, Ballet JJ, Brasseur P. Assessment of candidate anticryptosporidial agents in an immunosuppressed rat model. *J Infect Dis* 1993;167(3):766-8.
- Levecque C, Elbaz A, Clavel J, Richard F, Vidal JS, Amouyel P, et al. Association between Parkinson's disease and polymorphisms in the nNOS and iNOS genes in a community-based case-control study. *Hum Mol Genet* 2003;12(1):79-86.
- Levecque C, Elbaz A, Clavel J, Vidal JS, Amouyel P, Alperovitch A, et al. Association of polymorphisms in the Tau and Saitohin genes with Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004;75(3):478-80.
- Leynaert B, Korobaef, M, Jarvis, D, Chinn, S, Burney, P, Neukirch, F. Farm exposure in childhood and the risk of asthma, allergic rhinitis and atopy in adulthood. Results from the European Community Respiratory Health Survey (ECRHS). In: International society for environmental epidemiology (ISEE); 2001 2-5 septembre 2001; Garmisch-Partenkirchen: ISEE; 2001.
- Leynaert B, Neukirch C, Jarvis D, Chinn S, Burney P, Neukirch F. Does living on a farm during childhood protect against asthma, allergic rhinitis, and atopy in adulthood? *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164(10 Pt 1):1829-34.
- Leynaert B, Neukirch C, Kony S, Guenegou A, Bousquet J, Aubier M, et al. Association between asthma and rhinitis according to atopic sensitization in a population-based study. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113(1):86-93.
- Loiseau N, Gomis JM, Santolini J, Delaforge M, Andre F. Predicting the conformational states of cyclic tetrapeptides. *Biopolymers* 2003;69(3):363-85.
- Maccario J, Oryszczyn MP, Charpin D, Kauffmann F. Methodologic aspects of the quantification of skin prick test responses: the EGEA study. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111(4):750-6.
- Machelon V. Toxicité du plomb et fonctions ovariennes. *Reproduction Humaine et Hormones* 2000;XIII:552-557.
- Mage C, Bourgne H, Toullieu JM, Rondelaud D, Dreyfuss G. *Fasciola hepatica* and *Paramphistomum daubneyi*: changes in prevalences of natural infections in cattle and in *Lymnaea truncatula* from central France over the past 12 years. *Vet Res* 2002;33(5):439-47.
- Maillot C, Gargala G, Delaunay A, Ducrotte P, Brasseur P, Ballet JJ, et al. *Cryptosporidium parvum* infection stimulates the secretion of TGF-beta, IL-8 and RANTES by Caco-2 cell line. *Parasitol Res* 2000;86(12):947-9.
- Maraganore DM, Lesnick TG, Elbaz A, Chartier-Harlin MC, Gasser T, Kruger R, et al. UCHL1 is a Parkinson's disease susceptibility gene. *Ann Neurol* 2004;55(4):512-21.

- Marchand A, Barouki R, Garlatti M. Regulation of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene expression by CYP1A1 activity. *Mol Pharmacol* 2004;65(4):1029-37.
- Mariotte D, Comby E, Brasseur P, Ballet JJ. Kinetics of spleen and Peyer's patch lymphocyte populations during gut parasite clearing in *Cryptosporidium parvum* infected suckling mice. *Parasite Immunol* 2004;26(1):1-6.
- Marly X, Chevalier S, Buès M, Schwartzbrod J. Laboratory investigations of *Cryptosporidium parvum* oocysts adsorption properties. In: Rosbjerg et al, A B, editors. *International conference on Groundwater research; 2000 6-8 juin 2000; 2000*. p. 43-44.
- Marly X, Chevalier S, Bues M, Schwartzbrod J, Estevenon O. Experimental investigations and numerical modelling of *Cryptosporidium parvum* transport behaviour in aquifers. *Water Sci Technol* 2001;43(12):109-16.
- Mas M, Subra JF, Lagrange D, Pilipenko-Appolinaire S, Kermarrec N, Gauguier D, et al. Rat chromosome 9 bears a major susceptibility locus for IgE response. *Eur J Immunol* 2000;30(6):1698-705.
- Massaad C, Barouki R. An assay for the detection of xenoestrogens based on a promoter containing overlapping EREs. *Environ Health Perspect* 1999;107(7):563-6.
- Massaad C, Barouki R. Xénohormones : mode d'action et effets suspectés. *Médecine/Sciences* 1999;15:1362-1369.
- Massaad C, Coumoul X, Sabbah M, Garlatti M, Redeuilh G, Barouki R. Properties of overlapping EREs: synergistic activation of transcription and cooperative binding of ER. *Biochemistry* 1998;37(17):6023-32.
- Massaad C, Entezami F, Massade L, Benahmed M, Olivennes F, Barouki R, et al. How can chemical compounds alter human fertility? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2002;100(2):127-37.
- Matic I, Tenailon, O, Lecointre, G, Darlu, P, Radman M, Taddei, F, Denamur, E. Horizontal transfer of mismatch repair genes and the variable speed of bacterial evolution. In: Syvanen MaK, C.I., editor. *Horizontal gene transfer. 2nd Edition ed. London: Academic Press Inc; 2002*. p. 147-1555.
- Matic I, Babic A, Radman M. 2-aminopurine allows interspecies recombination by a reversible inactivation of the *Escherichia coli* mismatch repair system. *J Bacteriol* 2003;185(4):1459-61.
- Matic I, Taddei F, Radman M. No genetic barriers between *Salmonella enterica* serovar typhimurium and *Escherichia coli* in SOS-induced mismatch repair-deficient cells. *J Bacteriol* 2000;182(20):5922-4.
- Minoletti C, Santolini J, Haraux F, Pothier J, Andre F. Rebuilt 3D structure of the chloroplast f1 ATPase-tentoxin complex. *Proteins* 2002;49(3):302-20.
- Monpoeho S, Dehee A, Mignotte B, Schwartzbrod L, Marechal V, Nicolas JC, et al. Quantification of enterovirus RNA in sludge samples using single tube real-time RT-PCR. *Biotechniques* 2000;29(1):88-93.
- Monpoeho S, Maul A, Bonnin C, Patria L, Ranarijaona S, Billaudel S, et al. Clearance of human pathogenic viruses from sludge: study fo four stabilization processes using real-time RT-PCR and cell culture. *Appl Environ Microbiol* 2004;(in press).
- Monpoeho S, Maul A, Mignotte-Cadiergues B, Schwartzbrod L, Billaudel S, Ferre V. Best viral elution method available for quantification of enteroviruses in sludge by both cell culture and reverse transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol* 2001;67(6):2484-8.
- Nasseau M, Boublik Y, Meier W, Winterhalter M, Fournier D. Substrate-permeable encapsulation of enzymes maintains effective activity, stabilizes against denaturation, and protects against proteolytic degradation. *Biotechnol Bioeng* 2001;75(5):615-8.
- Odet F, Guyot R, Leduque P, Le Magueresse-Battistoni B. Evidence for similar expression of protein C inhibitor and the urokinase-type plasminogen activator system during mouse testis development. *Endocrinology* 2004;145(3):1481-9.
- Oryszczyn MP, Annesi-Maesano I, Charpin D, Kauffmann F. Allergy markers in adults in relation to the timing of pet exposure: the EGEA study. *Allergy* 2003;58(11):1136-43.
- Oryszczyn MP, Annesi-Maesano I, Charpin D, Paty E, Maccario J, Kauffmann F. Relationships of active and passive smoking to total IgE in adults of the Epidemiological Study of the Genetics and Environment of Asthma, Bronchial Hyperresponsiveness, and Atopy (EGEA). *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161(4 Pt 1):1241-6.
- Paris F, Balaguer P, Terouanne B, Servant N, Lacoste C, Cravedi JP, et al. Phenylphenols, biphenols, bisphenol-A and 4-tert-octylphenol exhibit alpha and beta estrogen activities and antiandrogen activity in reporter cell lines. *Mol Cell Endocrinol* 2002;193(1-2):43-9.
- Paris F, Servant N, Terouanne B, Balaguer P, Nicolas JC, Sultan C. A new recombinant cell bioassay for ultrasensitive determination of serum estrogenic bioactivity in children. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87(2):791-7.
- Payen L, Courtois A, Langouet S, Guillouzo A, Fardel O. Unaltered expression of multidrug resistance transporters in polycyclic aromatic hydrocarbon-resistant rat liver cells. *Toxicology* 2001;156(2-3):109-17.
- Perrilat-Menegaux F, Clavel J, Auclerc MF, Baruchel A, Leverger G, Nelken B, et al. Family history of autoimmune thyroid disease and childhood acute leukemia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003;12(1):60-3.
- Perrilat F, Clavel J, Auclerc MF, Baruchel A, Leverger G, Nelken B, et al. Day-care, early common infections and childhood acute leukaemia: a multicentre French case-control study. *Br J Cancer* 2002;86(7):1064-9.
- Perrilat F, Clavel J, Jaussent I, Baruchel A, Leverger G, Nelken B, et al. Family cancer history and risk of childhood acute leukemia (France). *Cancer Causes Control* 2001;12(10):935-41.
- Perrilat F, Clavel J, Jaussent I, Baruchel A, Leverger G, Nelken B, et al. Breast-feeding, fetal loss and childhood acute leukaemia. *Eur J Pediatr* 2002;161(4):235-7.
- Pesando D, Robert S, Huitorel P, Gutknecht E, Pereira L, Girard JP, et al. Effects of methoxychlor, dieldrin and lindane on sea urchin fertilization and early development. *Aquat Toxicol* 2004;66(3):225-39.
- Picard A, Palavan G, Robert S, Pesando D, Ciapa B. Effect of organochlorine pesticides on maturation of starfish and mouse oocytes. *Toxicol Sci* 2003;73(1):141-8.
- Picard K, Lhuguenot JC, Lavier-Canivenc MC, Chagnon MC. Estrogenic activity and metabolism of n-butyl benzyl phthalate in vitro: identification of the active molecule(s). *Toxicol Appl Pharmacol* 2001;172(2):108-18.
- Pinelli E, Poux N, Garren L, Pipy B, Castegnaro M, Miller DJ, et al. Activation of mitogen-activated protein kinase by fumonisin B(1) stimulates cPLA(2) phosphorylation, the arachidonic acid cascade and cAMP production. *Carcinogenesis* 1999;20(9):1683-8.
- Pradel N, Boukhors K, Bertin Y, Forestier C, Martin C, Livrelli V. Heterogeneity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from hemolytic-uremic syndrome patients, cattle, and food samples in central France. *Appl Environ Microbiol* 2001;67(6):2460-8.
- Pradel N, De Champs C, Palcoux JB, Sirot J, Forestier C, Joly B, et al. Ivertoxin-producing *Escherichia coli* infections: study of its prevalence in children in the Auvergne region. *Arch Pediatr* 2000;7 Suppl 3:544s-550s.
- Pradel N, Leroy-Setrin S, Joly B, Livrelli V. Genomic subtraction to identify and characterize sequences of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O91:H21. *Appl Environ Microbiol* 2002;68(5):2316-25.
- Pradel N, Livrelli V, De Champs C, Palcoux JB, Reynaud A, Scheutz F, et al. Prevalence and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle, food, and children during a one-year prospective study in France. *J Clin Microbiol* 2000;38(3):1023-31.
- Rabl A. Les bénéfices monétaires d'une amélioration de la qualité de l'air en Ile-de-France. *Pollution Atmosphérique* 1999;161:83-84.
- Rabl A, Spadaro J.V. Environmental damages and costs : an analysis of uncertainties. *Environnement International* 1999;25(1):29-46.
- Rabl A, Funk K. Electrical versus conventional vehicules : social costs and benefits in France. *Transportation Research* 1999.
- Rabl A, Spadaro J.V. Health costs of automobile pollution. *Rev Franç Allergol Immunol Clin* 2000;40(1):55-59.
- Rondelaud D, Abrous M, Dreyfuss G. The influence of different food sources on cercarial production in *Lymnaea truncatula* experimentally infected with *Digenea*. *Vet Res* 2002;33(1):95-9.
- Rondelaud D, Dreyfuss G, Bouteille B, Darde ML. Changes in human fasciolosis in a temperate area: about some observations over a 28-year period in central France. *Parasitol Res* 2000;86(9):753-7.
- Rondelaud D, Vignoles P, Abrous M, Dreyfuss G. The definitive and intermediate hosts of *Fasciola hepatica* in the natural watercress beds in central France. *Parasitol Res* 2001;87(6):475-8.
- Rondelaud D, Vignoles P, Dreyfuss G. The presence of predators modifies the larval development of *Fasciola hepatica* in surviving *Lymnaea truncatula*. *J Helminthol* 2002;76(2):175-8.
- Rousellon N, Delgènes J, Godon J. A new real time PCR (TaqMan PCR) system for detection of the 16S rDNA gene associated with fecal bacteria. *J Microb Method* 2004;59:15-22.
- Roussel F, Favennec L, Lemeteil D, Tayot J, Ballet JJ, Brasseur P. Biliary tract cryptosporidiosis immunosuppressed rat model. *Int J Parasitol* 1996;26(1):19-24.
- Salez L, Singer M, Balloy V, Creminon C, Chignard M. Lack of IL-10 synthesis by murine alveolar macrophages upon lipopolysaccharide exposure. Comparison with peritoneal macrophages. *J Leukoc Biol* 2000;67(4):545-52.
- Salmeron S, Liard R, Elkharrat D, Muir J, Neukirch F, Ellrodt A. Asthma severity and adequacy of management in accident and emergency departments in France: a prospective study. *Lancet* 2001;358(9282):629-35.
- Savignac M, Badou A, Delmas C, Subra JF, De Cramer S, Paulet P, et al. Gold is a T cell polyclonal activator in BN and LEW rats but favors IL-4 expression only in autoimmune prone BN rats. *Eur J Immunol* 2001;31(8):2266-76.
- Savignac M, Badou A, Moreau M, Leclerc C, Guery JC, Paulet P, et al. Protein kinase C-mediated calcium entry dependent upon dihydropyridine sensitive channels: a T cell receptor-coupled signaling pathway involved in IL-4 synthesis. *Faseb J* 2001;15(9):1577-9.
- Schvoerer E, Bonnet F, Dubois V, Cazaux G, Serceau R, Fleury HJ, et al. PCR detection of human enteric viruses in bathing areas, waste waters and human stools in Southwestern France. *Res Microbiol* 2000;151(8):693-701.
- Schvoerer E, Ventura M, Dubos O, Cazaux G, Serceau R, Gournier N, et al. Qualitative and quantitative molecular detection of enteroviruses in water from bathing areas and from a sewage treatment plant. *Res Microbiol* 2001;152(2):179-86.
- Siroux V, Pin I, Oryszczyn MP, Le Moual N, Kauffmann F. Relationships of active smoking to asthma and asthma severity in the EGEA study. *Epidemiological study on the Genetics and Environment of Asthma. Eur Respir J* 2000;15(3):470-7.
- Slama R, Eustache F, Ducot B, Jensen TK, Jorgensen N, Horte A, et al. Time to pregnancy and semen parameters: a cross-sectional study among fertile couples from four European cities. *Hum Reprod* 2002;17(2):503-15.

Soulage C, Perrin D, Berenguer P, Pequignot JM. Sub-chronic exposure to toluene at 40 ppm alters the monoamine biosynthesis rate in discrete brain areas. *Toxicology* 2004;196(1-2):21-30.

Sparfel L, Huc L, Le Vee M, Desille M, Lagadic-Gossman D, Fardel O. Inhibition of carcinogen-bioactivating cytochrome P450 1 isoforms by amiloride derivatives. *Biochem Pharmacol* 2004;67(9):1711-9.

Steffen C, Auclerc MF, Auvrignon A, Baruchel A, Kebaili K, Lambilliotte A, et al. Acute childhood leukaemia and environmental exposure to potential sources of benzene and other hydrocarbons; a case-control study. *Occup Environ Med* 2004;61(9):773-8.

Stenger A, Rozan, A, Willinger, M. Information on heavy metals and food safety : willingness to pay for risk reductions through some experimental actions. *risk and uncertainty in environmental economics* 2002;a paraître.

Stroheker T, Cabaton N, Berges R, Lamothe V, Lhuguenot JC, Chagnon MC. Influence of dietary soy isoflavones on the accessory sex organs of the Wistar rat. *Food Chem Toxicol* 2003;41(8):1175-83.

Stroheker T, Chagnon MC, Pinnert MF, Berges R, Canivenc-Lavier MC. Estrogenic effects of food wrap packaging xenoestrogens and flavonoids in female Wistar rats: a comparative study. *Reprod Toxicol* 2003;17(4):421-32.

Stroheker T, Picard K, Lhuguenot JC, Canivenc-Lavier MC, Chagnon MC. Steroid activities comparison of natural and food wrap compounds in human breast cancer cell lines. *Food Chem Toxicol* 2004;42(6):887-97.

Sultan C, Balaguer P, Terouanne B, Georget V, Paris F, Jeandel C, et al. Environmental xenoestrogens, antiandrogens and disorders of male sexual differentiation. *Mol Cell Endocrinol* 2001;178(1-2):99-105.

Tahiri B, Doco, T, Tressol, JC, Pellerin, P, Pepin, D, Rayssiguier, Y. Le rhamnogalacturonane II, un polysaccharide pectifique, diminue l'absorption intestinale et la rétention tissulaire du plomb chez le rat. *Bulletin de l'O.I.V.* 2001;841-842:100-107.

Tahiri M, Pellerin P, Tressol JC, Doco T, Pepin D, Rayssiguier Y, et al. The rhamnogalacturonan-II dimer decreases intestinal absorption and tissue accumulation of lead in rats. *J Nutr* 2000;130(2):249-53.

Tahiri M, Tressol JC, Doco T, Rayssiguier Y, Coudray C. Chronic oral administration of rhamnogalacturonan-II dimer, a pectic polysaccharide, failed to accelerate body lead detoxification after chronic lead exposure in rats. *Br J Nutr* 2002;87(1):47-54.

Takser L, Dellatolas G, Bowler R, Laplante N, Huel G. Predictive factors of manual dexterity and cognitive performance at 17 years: a 10-year longitudinal study in a rural area of France. *Percept Mot Skills* 2002;95(1):15-26.

Tang HW, Huel G, Campagna D, Hellier G, Boissinot C, Blot P. Neurodevelopmental evaluation of 9-month-old infants exposed to low levels of lead in utero: involvement of monoamine neurotransmitters. *J Appl Toxicol* 1999;19(3):167-72.

Taupeau C, Gaudin-Nome F, Lieberherr M, Machelon V. Lead (Pb2+) increases vascular endothelial growth factor -VEGF production in human post-LH ovarian granulosa cells and potentializes the estradiol effect on VEGF in the MCF-7 breast cancer cell line. *Environ Toxicol Pharmacol* 2004;sous presse.

Taupeau C, Poupon J, Nome F, Lefevre B. Lead accumulation in the mouse ovary after treatment-induced follicular atresia. *Reprod Toxicol* 2001;15(4):385-91.

Taupeau C, Poupon J, Treton D, Brosse A, Richard Y, Machelon V. Lead reduces messenger RNA and protein levels of cytochrome p450 aromatase and estrogen receptor beta in human ovarian granulosa cells. *Biol Reprod* 2003;68(6):1982-8.

Tenaillon O, Le Nagard H, Godelle B, Taddei F. Mutators and sex in bacteria: conflict between adaptive strategies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(19):10465-70.

Tenaillon O, Taddei F, Radman M, Matic I. Second-order selection in bacterial evolution: selection acting on mutation and recombination rates in the course of adaptation. *Res Microbiol* 2001;152(1):11-6.

Terouanne B, Tahiri B, Georget V, Belon C, Pujol N, Avances C, et al. A stable prostatic bioluminescent cell line to investigate androgen and antiandrogen effects. *Mol Cell Endocrinol* 2000;160(1-2):39-49.

Thibaut R, Debrauwer L, Rao D, Cravedi JP. Urinary metabolites of 4-n-nonylphenol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Sci Total Environ* 1999;233(1-3):193-200.

Tucker MA, Goldstein AM. Melanoma etiology: where are we? *Oncogene* 2003;22(20):3042-52.

Vaillant V, Espié E. Facteurs de risque de survenue des syndromes hémolytiques et urémiques liés à une infection à *Escherichia Coli* producteurs de shiga-toxine chez les enfants de moins de 15 ans en France. *INVS*; 2002 Juin 2002.

Van Grevenynghe J, Rion S, Le Ferrec E, Le Vee M, Amiot L, Fauchet R, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit differentiation of human monocytes into macrophages. *J Immunol* 2003;170(5):2374-81.

Van Grevenynghe J, Sparfel L, Le Vee M, Gilot D, Drenou B, Fauchet R, et al. Cytochrome P450-dependent toxicity of environmental polycyclic aromatic hydrocarbons towards human macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;317(3):708-16.

Varraso R, Massin N, Hery M, Fradier-Dusch M, Michaely JP, Fournier M, et al. Not only training but also exposure to chlorinated compounds generates a response to oxidative stimuli in swimmers. *Toxicol Ind Health* 2002;18(6):269-78.

Vassal S, Favennec L, Ballet JJ, Brasseur P. Disinfection of endoscopes contaminated with *Cryptosporidium parvum* oocysts. *J Hosp Infect* 2000;44(2):151.

Verger P, Hunault C, Rotily M, Baruffol E. Colloque "Epidemiologie, Environnement et Santé, Saint-Malo, 25-27 octobre 1999

Facteurs de variation des symptômes de stress post-traumatique cinq années après l'inondation de 1992 dans le Vaucluse. *Revue d'épidémiologie et de santé publique* 1999;48, suppl:2S44-2S53.

Verger P, Rotily M, Baruffol E, Boulanger N, Vial M, Sydor G, et al. Evaluation des conséquences psychologiques des catastrophes environnementales : une étude de faisabilité à partir des inondations de 1992 dans le Vaucluse (France). *Santé* 1999;9,5:313-318.

Vernhet L, Allain N, Le Vee M, Morel F, Guillouzo A, Fardel O. Blockage of multidrug resistance-associated proteins potentiates the inhibitory effects of arsenic trioxide on CYP1A1 induction by polycyclic aromatic hydrocarbons. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;304(1):145-55.

Vignoles P, Dreyfuss G, Rondelaud D. Radial growth and cercarial productivity of *Fasciola hepatica* in three species of young lymnaeid snails. *J Helminthol* 2002;76(3):269-72.

Vignoles P, Favennec L, Dreyfuss G, Rondelaud D. Highland populations of *Lymnaea truncatula* infected with *Fasciola hepatica* survive longer under experimental conditions than lowland ones. *Parasitol Res* 2002;88(4):386-8.

Vignoles P, Favennec L, Rondelaud D, Dreyfuss G. The experimental production of *Fasciola hepatica* metacercariae from three aquatic populations of *Galba truncatula*. *J Helminthol* 2003;77(3):275-7.

Vignoles P, Menard A, Rondelaud D, Chauvin A, Dreyfuss G. *Fasciola hepatica*: the characteristics of experimental infections in *Lymnaea truncatula* subjected to miracidia differing in their mammalian origin. *Parasitol Res* 2001;87(11):945-9.

Villatte F, Marcel V, Estrada-Mondaca S, Fournier D. Engineering sensitive acetylcholinesterase for detection of organophosphate and carbamate insecticides. *Biosens Bioelectron* 1998;13(2):157-64.

Villena I, Aubert D, Gomis P, Ferte H, Ingland JC, Denis-Bisiaux H, et al. Evaluation of a strategy for *Toxoplasma gondii* oocyst detection in water. *Appl Environ Microbiol* 2004;70(7):4035-9.

White-Koning ML, Hemon D, Laurier D, Tirmarche M, Jouglu E, Goubin A, et al. Incidence of childhood leukaemia in the vicinity of nuclear sites in France, 1990-1998. *Br J Cancer* 2004.

Zalko D, Costagliola R, Dorio C, Rathahao E, Cravedi JP. In vivo metabolic fate of the xeno-estrogen 4-n-nonylphenol in Wistar rats. *Drug Metab Dispos* 2003;31(2):168-78.

Zmirou D, Gofiti-Laroche L. *Prospectives studies*. . CRC Press; 2002.

Zureik M, Neukirch C, Leynaert B, Liard R, Bousquet J, Neukirch F. Sensitisation to airborne moulds and severity of asthma: cross sectional study from European Community respiratory health survey. *Bmj* 2002;325(7361):411-4.

● Les projets du programme 1996/2000

Depuis la date de réalisation des projets, des changements ont pu être apportés à l'intitulé du laboratoire.

Coordonnateur scientifique	Laboratoire	Intitulé du projet	Page
● ABRAINI Jacques 2000	Processus adaptatifs à l'environnement Université de Nancy I Faculté des sciences - BP 239 54506 Vandœuvre les Nancy	Etude comportementale et neurochimique du potentiel neurotoxique du toluène à faible concentration et du bruit lors d'une exposition simultanée à long terme : analyse de la part respective du toluène et du bruit et influence du sexe.	97
● ANDREMONT Antoine 1999	Laboratoire de Bactériologie Université Paris VII Hôpital Bichat-Claude Bernard 46, rue Henri Huchard 75877 Paris cedex 18	Etude de la prévalence de la résistance aux antibiotiques des bactéries colonisant l'homme au contact ou non avec les élevages porcins en France en 2000.	92
● ANDREOLETTI Laurent 1998	Laboratoire de Bactériologie CHU de Reims - rue du Général Koenig - 51100 Reims	Evolution de la quantification moléculaire des enterovirus infectieux comme marqueur de pollution virale des eaux de surface.	21
● ANNESI-MAESANO Isabella 1999	Epidémiologie et Biostatistique Inserm U472 - 16, avenue Paul Vaillant Couturier 97807 Villejuif	Environnement tropical et allergie infantile. Enquête transversale dans l'ensemble des élèves de 5e et 4e de Nouvelle Calédonie : prévalence de l'asthme, de la rhinite allergique et de l'eczéma et facteurs associés.	85
● AUGER Jacques 1996	Service d'Histologie -Embryologie Biologie de la Reproduction Hôpital Cochin - 27, rue du Faubourg Saint-Jacques - 75679 Paris cedex 14	Qualité du sperme, fonction de reproduction et fertilité chez l'homme, facteurs de variation et environnement.	49
● BALDI Isabelle 2000	LSTE / ISPED Université de Bordeaux 2 146, rue Léo Saignat 33076 Bordeaux cedex	Etude des troubles neurocomportementaux en lien avec une exposition prolongée aux pesticides : suivi à 4 ans des sujets de l'étude PHYTONER en Gironde	98
● BALEUX Bernard 1997	Ex-Laboratoire Hydrobiologie marine et continentale Ex-UMR-CNRS 5556 Université de Montpellier II - case 093 34095 Montpellier Cedex 05	Les aeromonas mésophiles indicateurs possibles de la qualité microbiologique des eaux	21
● BALLET Jean-Jacques 1998	Laboratoire d'Immunologie CHU - Clémenceau Avenue Georges Clémenceau 14033 Caen Cedex	Evaluation du risque sanitaire de cryptosporidiose par l'étude des réponses lymphocytaires T à des cibles immunodominantes de souches pathogènes de cryptosporidium parvum d'origine hydrique.	22
● BAROUKI Robert 1996	Toxicologie moléculaire Inserm U490 Université René Descartes 45, rue des Saint Pères 75270 Paris cedex 06	Détection de xénohormones grâce à l'utilisation de promoteurs hypersensibles aux récepteurs nucléaires	68
● BAROUKI Robert 2000	Toxicologie moléculaire Inserm U490 Université René Descartes 45, rue des Saint Pères – 75270 Paris cedex 06	Rôle du cytochrome P4501A1 dans la toxicité cellulaire de la dioxine	69
● BELLON Blanche 1997	INSERM U 430 Hôpital Broussais 96 rue Didot - 75014 Paris	Etude des mécanismes de tolérance aux effets immunopathologies de certains polluants métalliques	69
● BILLAUEDEL Sylviane 1997	Unité Fonctionnelle de Virologie Institut de Biologie 9, quai Moncousu 44035 Nantes Cedex 01	Recherche et quantification de virus entériques humains dans des boues de station d'épuration.	23
● BLOCK Jean-Claude 1999	CNRS UMR7564 - LCPME 405, rue de Vandœuvre – 54600 Villers les Nancy	Etude de l'action du chlore sur l'ADN bactérien et contrôle rapide de l'efficacité de la désinfection des eaux potables par le chlore.	24

Coordonnateur scientifique	Laboratoire	Intitulé du projet	Page
● BONNIN Alain (et DEROUBIN Marie Renée) 1996	Laboratoire de parasitologie CHU DIJON1, bd Jeanne d'Arc 21079 Dijon Cedex (Laboratoire Anjou Recherche 1 place de Turenne 94 47 St Maurice Cedex)	Etude de la viabilité et du typage génétique des oocystes de cryptosporidium et des cystes de giardia d'origine hydrique	25
● BRASSEUR Philippe 1997	Université de Rouen 1, rue Thomas Becket 76130 Mont Saint-Aignan	Etude de la pathogénicité et de la sensibilité aux imidazoles d'isolats de giardia d'origine hydrique	25
● BROCHARD Patrick 1997	LSTE / ISPED Université de Bordeaux 2 146, rue Léo Saignat 33076 Bordeaux cedex	Effets des pesticides sur la santé: Etude des effets neurocomportementaux à long terme auprès des ouvriers viticoles de Gironde	
● BROUSSOLLE Véronique 1998	Station de Technologie des Produits Végétaux INRA Domaine St Paul Site Agroparc 84914 Avignon Cedex 9	Clostridium botulinum dans l'environnement et les aliments : réservoirs et mécanismes de développement.	26
● BRUGERE Hubert 2000	INRA / UMR 1225 - ENV 23, chemin des capelles 31076 Toulouse cedex 03	Escherichia coli pathogènes dans les effluents d'abattoir : Evaluation du risque pour la santé publique	27
● BUENO Lionel 1997	Unité de Pharmacologie Toxicologie INRA 180 chemin de Tournefeuille - BP3 31931 Toulouse cedex 9	Etude des altérations anatomiques et fonctionnelles de la paroi intestinale induites par les nitrates, nitrites et les dérivés N-nitrosés contaminants de l'alimentation humaine	89
● BUES Michel 1998	Laboratoire Environnement, Géomécanique et Ouvrages Ecole Nationale Supérieure de Géologie Rue du Doyen Roubaud B.P. 40 54501 Vandœuvre Les Nancy Cedex	Périmètre de protection des ouvrages de captage et contamination microbiologique.	28
● CHARLIER Christophe 1999 Résumé des travaux non communiqué	CNRS UMR 6564 Université de Nice Sophia Antipolis et IDEFI 250 rue A. Einstein - Sophia Antipolis 1 06560 Valbone	Sécurité alimentaire, une nouvelle forme de protectionnisme?	
● CHARTIER Michel 1997 Résumé des travaux non communiqué	Département de Protection de la santé de l'homme - Service d'évaluation et de gestion des risques IRSN 60-68, avenue du Général Leclerc - BP6 92265 Fontenay aux roses cedex	Evaluation de l'exposition des riverains aux rejets radioactifs d'une installation nucléaire	70
● CHIGNARD Michel 1997	Unité de Défense Innée et Inflammation Institut Pasteur 25 rue du Docteur Roux - 75015 Paris	Aspects cellulaires et moléculaires de l'inflammation pulmonaire expérimentale d'origine atmosphérique	86
● CIAPA Brigitte 1997	UMR CNRS 7622 Université Pierre et Marie Curie 9, quai Saint-Bernard - Bât C - boîte 24 75252 Paris cedex 05	Impact des contaminants des eaux de boisson et de surface sur la maturation et la fécondation des gamètes femelles	50
● CLAVEL Jacqueline 1996	Recherches épidémiologiques et statistiques sur l'environnement et la santé Inserm U 170 16, av. Paul Vaillant-Couturier – 94807 Villejuif Cedex	Environnement et étiologies des leucémies algues de l'enfant	
● CLAVEL Jacqueline 1997	Recherches épidémiologiques et statistiques sur l'environnement et la santé Inserm U 170 16, av. Paul Vaillant-Couturier – 94807 Villejuif Cedex	Facteurs des risques environnementaux des leucémies aiguës de l'enfant Etude géographique et étude cas -témoins en population générale à partir du registre national des hémopathies malignes de l'enfant	71
● CLIQUET Florence 1999 Résumé des travaux non communiqué	Agence Française de Sécurité Sanitaire Alimentaire AFSSA Nancy BP 9 54220 Malzeville	Circulation du virus Puumala, prédiction et prévention de la FHSR (fièvre hémorragique avec syndrome rénal, infection à virus Puumala, Hantavirus, Bunyaviridae).	
● COMMENGES Daniel 1997	Equipe de Biostatistique Inserm E338 Université Vctor Segalen Bordeaux 2 146, rue Léo Saignat 33076 Bordeaux Cedex	Relation entre aluminium dans l'eau d'adduction et risque de maladie d'Alzheimer (Alma +)	29

Coordonnateur scientifique	Laboratoire	Intitulé du projet	Page
● CORDIER Sylvaine 1996	Groupe d'études de la reproduction chez l'homme et les mammifères Inserm U625 ,Université de Rennes I, Campus de Beaulieu Avenue du Général Leclerc 35042 Rennes Cedex	Risques neurotoxiques chez l'enfant liés à l'exposition au méthylmercure en Guyane française	51
● CORDIER Sylvaine 1998	Groupe d'études de la reproduction chez l'homme et les mammifères Inserm U625 ,Université de Rennes I, Campus de Beaulieu Avenue du Général Leclerc 35042 Rennes Cedex	Exposition maternelle aux solvants , susceptibilité génétique et risque de fente orale.	51
● COUDRAY Charles 1998	Unité, Maladies Métaboliques et Micronutriments INRA Centre de Theix 63122 ST Genes Champanelle	Influence de la complexation par le RG II des fruits et légumes sur l'absorption et la rétention des éléments toxiques (Pb, Ba, Sr) chez le rat.	90
● CRAVEDI Jean-Pierre 1997	Laboratoire des Xénobiotiques, INRA 180 chemin de Tournefeuille BP 3 31931 Toulouse cedex 9	Métabolisme chez le rat et chez l'homme d'un xeno-estrogène : le nonylphenol	52
● de BLAY Frédéric 2000	Laboratoire D'Allergologie. Inserm U425 Hôpitaux Universitaires de Strasbourg 1 rue canonnier –BP 426 67 091 Strasbourg	Rôle des endotoxines comme cofacteur de la réponse allergénique bronchique : Mesure de l'exposition au domicile et étude expérimentale pae des tests de provocation bronchique chez l'animal et l'homme	
● DE VATHAIRE 1997	Epidémiologie des cancers : radiocarcinogénèse et effets iatrogènes des traitements Inserm U605 Institut Gustave Roussy 39, rue Camille Desmoulins 94805 Villejuif cedex	Facteurs de risque des leucémies du sujet jeune en Polynésie française	
● DELAFORGE Marcel 1999	Pharmacologie et Immunologie CEA Saclay DSV/DRM/SPI Bât 136 – 91191 Gif sur Yvette Cedex	Métabolisme hépatique de composés peptidiques ou pseudopeptidiques produits par microorganismes : mécanismes de protection ou d'intoxication.	92
● DEROUIN Francis 1998	Laboratoire de Parasitologie-Mycologie Faculté de Médecine 15 rue de l'École de Médecine 75006 Paris	Etude prospective de la contamination parasitaire des eaux de piscine, en particulier par les microsporidies, cryptosporidies et Giardia.	29
● DESENCLOS Jean-Claude 1999	Institut de Veille Sanitaire 12, rue du Val d'Osne 94415 Saint Maurice Cedex	Facteurs de risques de survenue des syndromes hémolytiques et urémiques (SHU) par infection à Escherichia Coli producteurs de vérotoxines (VTEC) chez l'enfant de moins de 15 ans en France.	94
● DIVIES Charles 1996	Laboratoire de Microbiologie ENSBANA 1 esplanade Erasme 2000 Dijon	Evaluation des risques liés au mode de contamination des produits alimentaires par la bactérie des genres Listeria et des entérobactéries sous forme de cellules libres et immobilisées	
● DOR Frédéric 1997	Institut de Veille Sanitaire 12, rue du Val d'Osne 94415 Saint-Maurice cedex	Validation d'un modèle d'estimation de l'exposition humaine : Estimation de l'exposition aux HAP des travailleurs des sites des anciennes usines à gaz.	73
● DREYFUSS Gilles 1998	Laboratoire de Microbiologie-Parasitologie Faculté de Pharmacie 2 rue du Dr Marcland 87025 Limoges Cedex	La dismatose à Fasciola Hepatica Linne. Les origines de la contamination humaine dans les cressonnières naturelles et les prairies inondables et la dissémination des parasites flottants.	30
● DUBOW Michael Scott 1998	Université Paris Sud (Paris XI) Bât 400-409-360 - 15, rue Georges Clémenceau - 91405 Orsay cedex	Evaluation de l'impact de polluants environnementaux (tributylétain, mercure et cadmium) sur la santé humaine	
● DUPONT Yves 1998	LASAR Université de Caen MRSH Lasar 111 - Département de Sociologie - Esplanade de la Paix 14032 Caen Cedex	Eau, information et santé.	

Coordonnateur scientifique	Laboratoire	Intitulé du projet	Page
● ETIENNE Jérôme et LEVI Yves 1998	Pathologie des Staphylocoques Inserm E230 Faculté de Médecine - Laboratoire de Bactériologie RTH Laennec - 7 rue Guillaume Paradin 69372 Lyon Cedex 08	Ecologie et maîtrise de des légionnelles et autres pathogènes opportunistes dans les réseaux d'eaux thermales.	35
● FARDEL Olivier 2000	Détoxication et réparation tissulaire Inserm U620 Faculté de Pharmacie 2, avenue du Prof. L. Bernard 35043 Rennes	Bases cellulaires et moléculaires de l'absorption, de la cytotoxicité et de l'élimination de cancérigènes chimiques(hydrocarbures polycycliques aromatiques) contaminants de l'environnement	74
● FERLEY Jean Pierre	Centre Alpin d'Epidémiologie et de Prévention Sanitaires -CAREPS 20 rue Chenoise 38 000 Grenoble	Evaluation du risque microbiologique d'origine hydrique validation épidémiologique des fonctions dose réponse	
● FORESTIER Christian 1998	Laboratoire de Bactériologie Faculté de Pharmacie - Université d'Auvergne 28, place H. Dunant 63000 Clermont Ferrand	Escherichia coli producteurs de vérotoxines d'origine environnementale et impliqués en clinique humaine : analyse comparative permettant d'établir les caractéristiques liées au pouvoir pathogène de ces bactéries responsables d'intoxications alimentaires	94
● FOURNIER Didier1998	Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale IPBS Université Paul Sabatier - Toulouse III 118, route de Narbonne 31062 Toulouse cedex 4	Détection des contaminants phytosanitaires par utilisation de biocapteurs.	31
● FRANCON Jacques 1999	Transduction hormonale et régulation cellulaire-Inserm U486 Faculté de Pharmacie 5, rue Jean-Baptiste Clément 92296 Chatenay Malabry cedex	Identification de gènes dont l'expression est altérée par les biphényles polychlorés (PCBs) au cours du développement néonatal du système nerveux central. Relations avec la voie de signalisation des hormones thyroïdiennes.	53
● GINOT Luc 1997	Service Commun Hygiène et Sécurité Mairie d'Aubervilliers 31/33 rue de la Commune de Paris - 93308 Aubervilliers cedex	Diminution du risque d'intoxication saturnine des enfants par réduction de la présence du plomb dans l'habitat ancien: Evaluation de procédures intégrées dans les interventions classiques de réhabilitation (étude de faisabilité)	
● GINOT Luc 1999	Service Commun Hygiène et Sécurité Mairie d'Aubervilliers 31/33 rue de la Commune de Paris - 93308 Aubervilliers cedex	Diminution du risque d'intoxication saturnine des enfants par réduction de la présence du plomb dans l'habitat ancien	102
● GODON Jean-Jacques 1999	Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, INRA Avenue des Etangs 11100 Narbonne	Mesures moléculaires des transferts de contaminations microbiennes dues à l'utilisation, en agriculture, des boues de station d'épuration.	32
● GUENEL Pascal 1997	Recherches épidémiologiques et statistiques sur l'environnement et la santé Inserm U7016 avenue Paul Vaillant Couturier 94800 Villejuif cedex	Recherche des facteurs de risque alimentaires environnementaux et génétiques des cancers de la thyroïde dans une population à incidence élevée : l'exemple de la Nouvelle-Calédonie	75
● HAGUENOER Jean-Marie 1997	Service de Toxicologie - Hydrologie - Hygiène Faculté des sciences pharmaceutiques et biologiques de Lille 3, rue du professeur Laguesse BP 83 - 59006 Lille cedex	Environnement et activités humaines Etude d'un secteur pollué par les métaux. Métaux et effets précoces sur la santé	
● HENNIION Marie Claire 2000	Ecole Supérieure de Physique Chimie 10, rue Vauquelin 75231 Paris cedex 05	Mise au point d'un biocapteur pour la détection sur site du risque toxique associé aux efflorescences de cyanobactéries	
● HUEL Guy 1996	Epidémiologie et Biostatistique Inserm U472 - 16, avenue Paul Vaillant Couturier 94807 Villejuif Cedex	Effet de l'exposition maternelle au plomb sur le développement psychomoteur de l'enfant et de l'adolescent	53
● HUEL Guy 1999	Epidémiologie et Biostatistique Inserm U472 16, avenue Paul Vaillant Couturier 94807 Villejuif Cedex	Evolution de l'imprégnation de la population française vis à vis du cadmium, du mercure et du plomb	101

Coordonnateur scientifique	Laboratoire	Intitulé du projet	Page
● HUMBERT Jean François 2000	Centre alpin de recherche sur les réseaux trophiques des écosystèmes limniques, INRA, 75, avenue de corzent - BP 511 – 74203 Thonon	Mise au point d'outils pour le suivi de la dynamique des peuplements de cyanobactéries et pour l'évaluation du risque toxique	33
● ITEMAN Isabelle et TANDEAU DE MARSAC Nicole 1999	Physiologie microbienne Institut Pasteur - 28, rue du Docteur Roux - 75724 Paris cedex 15	Développement et validation d'outils moléculaires pour l'identification des cyanobactéries toxiques dans l'environnement.	34
● JACQUES-JOUVENOT Dominique 2000	UFR des sciences, du langage, de l'homme, et de la société 30, rue Mégevand 25030 Besançon cedex	Perceptions et représentations des risques en relation avec les zoonoses liées à l'alimentation et à l'environnement l'échinococcose alvéolaire comme modèle	103
● JAU RAND Marie Claude 1996	Oncogénèse des tumeurs respiratoires et urogénitales Inserm E337 Faculté de médecine 8, rue du Général Sarrail 94010 CRETEIL Cedex	Développement d'un modèle animal permettant l'évaluation de l'implication des fibres d'amiante dans l'étiologie du mésothéliome. Intérêt pour l'étude des fibres de remplacement	75
● JAU RAND Marie-Claude 2000	Oncogénèse des tumeurs respiratoires et urogénitales Inserm E337 Faculté de médecine 8, rue du Général Sarrail 94010 CRETEIL Cedex	Validité d'un modèle expérimental pour l'évaluation de l'implication des fibres d'amiante dans l'étiologie du mésothéliome et pour l'étude du potentiel toxique de fibres de remplacement	75
● JEGOU Bernard 1998	Groupe d'études de la reproduction chez l'homme et les mammifères - Inserm U625 Université de Rennes I Campus de Beaulieu Avenue du Général Leclerc 35042 Rennes Cedex	Conception et développement d'un test original le FEGA permettant de révéler et d'analyser les effets des perturbateurs endocriniens sur le développement foetal testiculaire.	54
● KAUFFMANN Francine 1996 et 2000	Epidémiologie et Biostatistique Inserm U472 16, avenue Paul Vaillant Couturier 94807 Villejuif Cedex	Etude épidémiologique des facteurs Génétiques et Environnementaux de l'Asthme, l'hyperréactivité bronchique et l'atopie (EGEA) 1991-2001. Etude de faisabilité en vue d'une étude longitudinale	86
● KOLF-CLAUW Martine 1998	Ecole Nationale Vétérinaire 23, chemin des Capelles 31076 Toulouse cedex 03	Transport et accumulation du cadmium alimentaire.	91
● LAFON Marie-Edith 1999	Laboratoire de Virologie Université de Bordeaux 2 2146, rue Léo Saignat 33076 Bordeaux cedex	Prévalence de la contamination virale des eaux évaluée par de techniques moléculaires. Place des 'small round structured virus'.	34
● LAURIER Dominique 1999	Laboratoire d'épidémiologie IRSN 92262 Fontenay aux Roses cedex	Exposition environnementale aux rayonnements ionisants et risque de leucémie chez les enfants.	76
● LEGLISE Marie Chantal 1998 Résumé des travaux non communiqué	Laboratoire de Bio-géno-toxicologie Institut de synergie des sciences et de la santé Hôpital Morvan, Ave Foch 29609 Brest Cedex	Etude des effets suppressifs et génotypiques des produits phytosanitaires sur modèles cellulaires humains expérimentaux	
● LEMAGUERESSE Brigitte 1998	Inserm U329 Hôpital Debrousse 29, rue Sœur Bouvier 69322 Lyon cedex 05	Incidence d'une exposition in utero au bisphénol A sur l'organogénèse testiculaire	
● LHUGUENOT Jean-Claude 1999	ENSBANA, Université de Bourgogne UMR Toxicologie Alimentaire 1, esplanade Erasme 21000 Dijon	Etude des potentiels oestrogénomimétiques de molécules issues d'emballages plastiques et comparaison avec les potentiels oestrogénomimétiques de flavonoïdes alimentaires chez le rat mâle et femelle afin d'évaluer les risques liés à ces différentes molécules	55
● LIEBERHERR Michèle 2000 Projet en cours,	CNRS UPR 1524 INRA Domaine de Vilvert - Bâtiment 221 - 78350 Jouy en Josas	Micropolluants des eaux à effets de modulateurs endocriniens (xénooestrogènes) : impact sur le formation osseuse et l'angiogénèse au cours du développement	56
● MACHELON Véronique 1997	Cytokines et immunorégulation Inserm U131 32 rue des Carmets 92140 Clamart	Toxicité du plomb et fonctions ovariennes	56

Coordonnateur scientifique	Laboratoire	Intitulé du projet	Page
● MASSUELLE Marie-Hélène 1998 Résumé des travaux non communiqué	IRSN Service d'Evaluation et des Gestion des Risques - B.P. 6 92265 Fontenay aux roses Cedex	Gestion des sites contaminés par les substances radioactives : analyse et synthèse des politiques publiques dans divers pays.	
● MATIC Yvan 1999	Génétique moléculaire, évolutive et médicale Inserm U571 Faculté de Médecine "Necker - Enfants malades", 156, rue de Vaugirard 75730 Paris cedex 15	Plasticité du génome des micro-organismes et environnement : mutateurs comme facteurs de risque pour l'apparition et la transmission de la résistance aux antibiotiques.	96
● MONFORT Patrick 2000	Ecosystèmes lagunaires, CNRS UMR5119, Université de Montpellier 2 34095 Montpellier cedex 05	Survie et maintien du pouvoir pathogène de Salmonella dans l'environnement aquatique anthropisé	36
● MULTIGNER Luc 1997	Groupe d'études de la reproduction chez l'homme et les mammifères, Inserm U625 Université de Rennes I, Campus de Beaulieu Avenue du Général Leclerc 35042 Rennes Cedex	Exposition aux éthers de glycol et fonction testiculaire. Approche épidémiologique	57
● MULTIGNER Luc 1999	Groupe d'études de la reproduction chez l'homme et les mammifères, Inserm U625 Université de Rennes I, Campus de Beaulieu Avenue du Général Leclerc 35042 Rennes Cedex	Impact des pollutions environnementales sur la reproduction de la faune sauvage.	58
● NADIF Rachel 1997	Epidémiologie et Biostatistique, Inserm U472 16 avenue Paul-Vaillant Couturier 94807 Villejuif cedex	Effets sur la santé de l'exposition aux sous-produits de désinfection de l'eau	36
● NEUKIRCH Françoise 2000	Inserm U408 Faculté de Médecine X. Bichat 16, rue Henri Huchard BP 416 75870 Paris cedex 18	Sensibilisation allergique, asthme, rhinite allergique et infections dans la petite enfance	87
● NICOLAS Jean-Claude 2000	Endocrinologie Moléculaire et cellulaire des cancers, Inserm U540 60, rue de Navacelles 34090 Montpellier	Identification de substances chimiques interférant avec les réponses endocrines : application à la surveillance de l'eau	37
● PALLARDY Marc 1999	Récepteurs et signalisation des interleukines Inserm U461 Faculté de Pharmacie Paris XI 5, rue Jean-Baptiste Clément 92296 Chatenay Malabry	Cellules dendritiques et allergie aux produits chimiques.	89
● PARENT-MASSIN Dominique 1999	ESMISAB, Microbiologie et sécurité alimentaire Technopôle Brest Iroise 29280 Plouzane	Evaluation du risque pour la santé humaine induit par la présence simultanée de mycotoxines fusariennes sur les denrées alimentaires : analyse des effets hématotoxiques, immunotoxiques et mise au point d'un modèle prédictif.	
● PARKIN Maxwell 1997	Centre international de recherche sur cancer CIRC, 150 cours Albert Thomas 69372 LYON cedex 08	Etude sur l'association entre exposition aux herbicides contaminés par dioxines et le cancer (sarcomes et lymphomes non-Hodgkiniens) dans le sud Vietnam	77
● PELLETIER Lucette et Philippe DRUET 1997	Centre de physiopathologie, Inserm U 563 Hôpital PURPAN Département de Génétique Bât Lefebvre - Place du Dr Baylac 31059 Toulouse cedex	Induction de désordres immunopathologiques par HgCl2 Définition des conditions, des mécanismes de la cible moléculaire et de facteurs de susceptibilité	100
● PINON Jean-Michel 2000	Laboratoire Parasitologie Micologie UFR Médecine, 51, rue Cognacq Jay 51096 Reims cedex	Evaluation du risque sanitaire de contamination toxoplasmique d'origine hydrique	38
● PIPY Bernard 1998	Université Paul Sabatier Toulouse III UPS-EA2405 - Inserm IFR31 CHU Rangueil 1, avenue Jean Poulhes 31403 Toulouse cedex 4	Altérations fonctionnelles et moléculaires des cellules impliquées dans la réponse immune par la Fumosinine B1, mycotoxine contaminant l'alimentation de l'Homme	78
● POUJEOL Philippe 1999	CNRS UMR 6548	Détermination de l'altération de la fonction rénale chez le rat	

Coordonnateur scientifique	Laboratoire	Intitulé du projet	Page
	Université Nice Sophia Antipolis Parc Valrose 06108 Nice cedex 2	exposé de façon chronique et aiguë aux métaux lourds et mise au point de tests de toxicité sur des cellules rénales en culture primaire.	101
● PUGEAT Michel 1997	Fédération d'Endocrinologie du Pôle Est Inserm : ERIT-M 322 Hopital Neuro Cardio Bât HPGO, aile A159 boulevard Pinel 69394 Lyon cedex 03	Interaction des xénobiotiques avec la protéine de liaison des stéroïdes sexuels (SBP/SHBG) : conséquences sur leur biodisponibilité in vivo	59
● RABL Ari 1996	ARMINE, Ecoles des Mines 60, boulevard Saint-Michel 75272 PARIS Cedex 06	Analyse coût-bénéfice des politiques de la lutte contre la pollution: validation d'outils à partir du cas de la pollution particulaire de l'air en Ile-de-France	103
● RAINELLI Pierre 1999	Economie et sociologie rurale rue Adolphe Bobierre - CS 61103 35011 Rennes cedex	Santé, environnement et consommation alimentaire.	104
● RAOULT Didier 2000	Unité des Rickettsies, CNRS UMR6020, IFR48 Faculté de Médecine, 27 Bd Jean Moulin, 13385 Marseille cedex 05	Recherche dans les eaux hospitalières de nouvelles espèces bactériennes éventuellement pathogènes par co-culture d'amibes	39
● ROBE Marie-Christine et IELSCH Géraldine 1997	IRSN - Direction de l'Environnement et de l'Intervention - Service d'analyses des risques liés à la Géosphère - Laboratoire d'études du Radon et d'analyse des risques - BP 17 92262 Fontenay aux Roses cedex	Mise au point d'une méthodologie permettant l'élaboration d'un outil cartographique prédictif en vue d'identifier les zones à fortes concentrations de radon	79
● STENDEL Bénédicte 2000 Projet en cours,	Epidémiologie et statistique sur l'environnement et la santé Inserm U170 16, avenue Paul Vaillant Couturier 94807 Villejuif cedex	Rôle des facteurs environnementaux dans la progression des néphropathies glomérulaires	
● TUBERT-BITTER Pascale 1998	Epidémiologie et Biostatistique Inserm U472 16 avenue P. Vaillant Couturier 94807 Villejuif Cedex	Validité du cheveu en tant qu'indicateur d'imprégnation de populations enfantines vis-à-vis du risque saturnin.	105
● TZOURIO Christophe 1996 et 1998	Inserm Unité 360 Hôpital de la Salpêtrière 75651 Paris Cedex 13	Exposition aux produits phytosanitaires et maladie de Parkinson	98
● VERGER Pierre 1996	ORS PACA 23 rue Stanislas Torrents 13006 Marseille	Evaluation épidémiologique des effets psychiques d'une catastrophe environnementale en France	106
● VERGNAUD 1996 Résumé des travaux non communiqué	Bureau d'Economie Théorique et Appliquée ULP CNRS UMR 7522 Université Strasbourg I 61 avenue de la Forêt Noire 67085 Strasbourg Cedex	Env. et santé : une réflexion théorique et méthodologique sur l'évaluation économique	
● ZMIROU Denis 1996	Département de Santé Publique Faculté de Médecine Université Joseph Fournier Grenoble	L'évaluation du risque microbiologique d'origine hydrique : un état de l'art et des perspectives.	40
● ZMIROU Denis 1998, 1999	Département de Santé Publique Faculté de Médecine Université Joseph Fournier Grenoble	L'évaluation du risque microbiologique d'origine hydrique : validation épidémiologique des fonctions dose réponse du risque viral ; évaluation du risque parasitaire	

Composition du Conseil scientifique du programme 1996-2000

Présidence

- **1996-1998 Denis HEMON** Unité de Recherches Epidémiologiques et Statistiques sur l'Environnement et la Santé, Inserm, Villejuif
- **1999-2002 Marcel GOLBERG** Unité Epidémiologie, Santé Publique et Environnement Professionnel et Général, Inserm, Saint-Maurice

Membres du Conseil scientifique

- **Jean-Michel ALONSO** Unité des Neisseria , Institut Pasteur, Paris
- **Antoine ANDREMONT** C.H.U. Bichat Claude Bernard, Paris
- **Denis BARD** Ecole Nationale de Santé Publique, Rennes
- **Robert BAROUKI** Toxicologie Moléculaire, Université René Descartes, Inserm, Paris
- **Philippe BEAUNE** Toxicologie Moléculaire, Université René Descartes, Inserm, Paris
- **Jean BIGNON** Biopathologie et Toxicologie pulmonaire, Hôpital Henri Mondor, Inserm, Créteil.
- **Philippe BRASSEUR** Laboratoire de Bactériologie, Hôpital Charles Nicolle, Rouen
- **Olivier CHANEL** Groupe de Recherche en Economie Quantitative, Marseille
- **William DAB** Service des études médicales, EDF
- **Philippe DRUET** Pathologie Rénale et vasculaire, Hôpital Purpan, Inserm, Toulouse
- **Michèle FARDEAUX** Recherches en Economie de la Santé, Hôpital Bicêtre, Inserm,
- **Bernard FESTY** Faculté de Pharmacie , Université René Descartes, Paris
- **Pierre GALTIER** Laboratoire Pharmacologie-Toxicologie, Inra, Toulouse
- **Patrick GRIMONT** Unité « Biodiversité des Bactéries Pathogènes Emergentes », Pasteur, Paris
- **Philippe HARTEMANN** Laboratoire D'Hygiène et de recherche en Santé Publique, Faculté de Médecine , Inserm, Nancy
- **Bernard JEGOU** Groupe d'Etude de la Reproduction chez l'Homme et chez les Mammifères, Inserm, Rennes
- **Francine FAUFFMANN** Unité Epidémiologie et Statistique, Inserm, Villejuif
- **Hélène KOPECKA** Virologie Moléculaire, Institut Pasteur, Paris
- **Claude LAMBRE** AFSSA, Maisons- Alfort
- **Yvon Le MOULLEC** Laboratoire d'Hygiène de la Ville de Paris
- **Jean Yves MARIE** Centre de Bioinformatiques, Université de Paris VII, Inserm
- **Isabelle MOMAS** Université René Descartes, Laboratoire d'Hygiène et de Santé Publique, Paris
- **Luc MULTIGNER** Groupe d'Etude de la Reproduction chez l'Homme et chez les Mammifères, Inserm, Rennes
- **Alain MUZET** Laboratoire de Physiologie et Psychologie Environnementale,
- **Gérard PASCAL** Centre National D'Etudes et de Recommandations sur la nutrition, Paris
- **Jeannine PIERRET** Centre d'Enseignement et Recherche en Mécanique des Sols, Paris
- **Yves PIEMONT** Institut de Bactériologie, Faculté de médecine, Strasbourg
- **Bernard SALLES** Institut de Pharmacologie et Biologie Structurale, CNRS, Narbonne
- **Denis ZMIROU** Département de Santé Publique, Université Joseph Fourier, Grenoble

Composition du Conseil scientifique du programme 2002-2006

Présidence

- **Sylvaine CORDIER** Groupe d'Etude de la Reproduction chez l'Homme et chez les Mammifères, Inserm, Rennes,

Membres du Conseil scientifique

- **Antoine ANDREMONT** C.H.U. Bichat Claude Bernard, Paris
- **Denis BARD** Ecole Nationale de Santé Publique, Rennes
- **Hafid BAROUDI** Institut National Des Risques Industriels, Verneuil en Halatte
- **Robert BAROUKI** Université René Descartes, Toxicologie Moléculaire, Inserm, Paris
- **Philippe BRASSEUR** Institut Pasteur, Dakar
- **Pierre GALTIER** Laboratoire de Pharmacologie Toxicologie, Inra, Toulouse
- **Pascal GUENEL** Recherches Epidémiologiques et Statistiques sur l'Environnement et la Santé, Inserm, Villejuif,
- **Dominique GUYONNET** Bureau des Ressources Géologiques et Minières, Orléans
- **Philippe HARTEMANN** Laboratoire D'Hygiène et de recherche en Santé Publique - Faculté de Médecine Nancy
- **Perrine HOËT** Unité de Toxicologie Industrielle et Pathologie Professionnelle, Université catholique de Louvain, Belgique
- **Hélène KOPECKA** Retraité CNRS
- **Claude LAMBRE** Direction Générale de la Santé, Ministère de la Santé et de la Protection Sociale
- **Yvon Le MOULLEC** Laboratoire d'Hygiène de la Ville de Paris
- **Isabelle MOMAS** Université René Descartes, Laboratoire d'Hygiène et de Santé Publique, Paris
- **Luc MULTIGNER** Groupe d'Etude de la Reproduction chez l'Homme et chez les Mammifères, Inserm, Rennes
- **Yves PIEMONT** CHU de Strasbourg, Institut de Bactériologie - Faculté de médecine, Strasbourg
- **André OUDIZ** Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, Fontenay aux Roses
- **Marie Joseph SAUREL** Recherche Epidémiologique en Santé Périnatale, Inserm, Villejuif