

## **Une alternative au bioessai de létalité sur la Truite arc-en-ciel**

*La culture primaire d'hépatocyte de truite arc-en-ciel est proposée comme méthode alternative au bioessai de létalité avec la Truite arc-en-ciel. Celle-ci consiste à exposer des hépatocytes cultivées in vitro au lieu d'exposer les poissons à l'échantillon. Les avantages de cette alternative sont les suivants :*

- 1) Réduction considérable du nombre de poissons dans les essais toxicologiques ;*
- 2) Réduction des coûts ;*
- 3) Facilité d'accroître l'information toxicologique telle que l'évaluation de la génotoxicité, des métallothionéines et des oxydases à fonction mixte;*
- 4) Temps de réponse plus rapide: les hépatocytes ne requièrent que 48 h d'exposition aux toxiques au lieu de 96 h qui est normalement requis chez la Truite.*

*Les résultats de cytotoxicité obtenus avec le modèle hépatocyte (MH) ont montré que l'on peut identifier les effluents toxiques chez la Truite de ceux qui ne le sont pas dans 90 % des cas. Ce bioessai peut être employé dans certaines études de dépistage au lieu du bioessai standard avec la Truite arc-en-ciel.*

### **POINTS SAILLANTS**

- Le MH diminue considérablement le sacrifice des poissons dans les évaluations toxicologiques des rejets (3 poissons au lieu de 120 par échantillon).
- Le MH requiert 48 h d'exposition avec le rejet industriel au lieu de 96 h.
- Le MH nécessite qu'une fraction du volume (5 ml) du rejet industriel normalement nécessaire pour le bioessai Truite (60 à 120 L).
- Ce modèle cellulaire a été validé avec des échantillons réels i. e., avec des rejets industriels représentatifs des différents secteurs économiques de la région du Québec.
- Le MH peut être aussi employé pour étudier les effets sublétaux des mélanges complexes.
- Le MH peut être transféré dans divers laboratoires d'essai.

### **APPLICATIONS IMMÉDIATES**

- Test complémentaire au bioessai avec la Truite dans les évaluations écotoxicologiques des rejets industriels.
- Le MH peut être employé pour évaluer la persistance des contaminants (e.g.,

l'effet de la biodégradation de l'échantillon par des bactéries).

- Les données bioanalytiques peuvent être intégrées dans des outils de gestion des rejets industriels comme le barème d'effet écotoxique potentiel (BEEP).

## **APPLICATION FUTURE**

- Test de dépistage dans l'évaluation de la toxicité des mélanges complexes tels les rejets industriels et municipaux, les lixiviats et les extraits organiques de sédiments marins ou dulcicoles, et les eaux usées.

## **PROBLÉMATIQUE**

- 1) Le bioessai Truite sacrifie de 60 à 120 truites pour l'évaluation de la toxicité d'un rejet industriel.
- 2) Le bioessai Truite requiert un volume pouvant varier de 20 à 100 litres de l'effluent industriel selon la toxicité intrinsèque de l'échantillon.
- 3) Le bioessai Truite ne mesure que l'effet de mortalité et ne fournit aucune information sur la toxicité sublétales des mélanges.
- 4) Le bioessai Truite requiert une exposition de 96 h à l'échantillon, période assez longue si l'on désire obtenir cette donnée plus rapidement.

## **SOLUTION**

En employant des cellules (i.e., les hépatocytes de truite) au lieu des poissons, le rendement bioanalytique est significativement amélioré en terme de coût et de rapidité d'exécution. De plus, la

valeur éthique du bioessai est également améliorée puisque le nombre de poisson passe de 120 à 3 par échantillon. De plus, le temps d'exposition est diminué de moitié (48 h) avec le MH. Finalement, le MH a été validé en fonction du bioessai de létalité avec la Truite de sorte que l'alternative peut identifier les rejets industriels qui sont susceptibles d'être nocifs pour la Truite.

De plus, la mesure des effets sublétaux d'intérêts pour les stratégies de protection environnemental se fait beaucoup facilement avec un modèle cellulaire. Le MH se prête donc plus aisément, en termes de coûts et de facilité d'analyse, à l'étude des mécanismes d'action des contaminants environnementaux. Par exemple, le stress occasionné par une exposition à de faibles concentrations de métaux lourds, comme le zinc, le cuivre le cadmium et le mercure, peut être mesuré par la mesure de l'induction des métallothionéines. Le stress occasionné par la présence de substances organiques coplanaires, comme les dioxines, furannes, hydrocarbures aromatiques polycycliques et certains biphényles polychlorés, peut se mesuré selon l'induction des oxydases à fonction mixte dans les hépatocytes.

Finalement, un critère d'effet d'intérêt pour la protection de l'environnement est celui de la génotoxicité i. e, les dommages à l'ADN. Ceux-ci constituent la toute première étape dans le développement de dommages irréversibles tels les mutations génétiques dont certaines peuvent être néfastes pour la survie de l'organisme voire même de la population. Le cancer représente un cas bien connu de ce syndrome génotoxique. Notons que les effets sublétaux ci-haut mentionnés ont été validé avec le bioessai truite de sorte que l'alternative peut prédire ces derniers qui

pourraient survenir dans le foie du poisson exposé à des rejets industriels.

## PRINCIPES

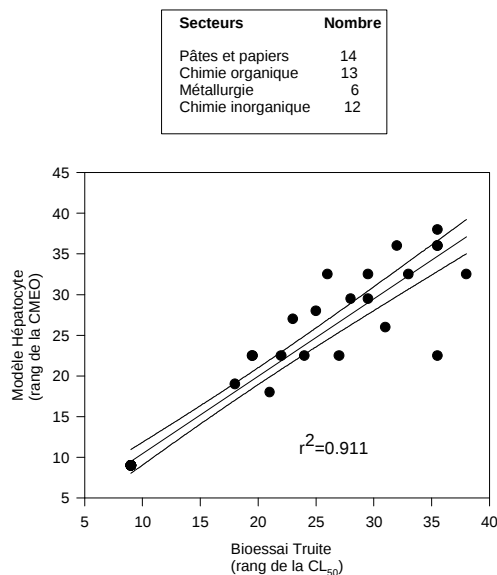
### *L'évaluation de la toxicité*

Les hépatocytes de Truite arc-en-ciel sont préparés à partir de 3 jeunes Truites de 15 à 25 cm puis exposés à différentes concentrations pendant 48 h du rejet industriel à 15°C. Après cette période d'incubation, les cellules sont retirées du milieu d'exposition et la viabilité cellulaire est déterminée selon le test d'exclusion à l'iodure de propidium, une sonde moléculaire qui rend les cellules mortes fluorescentes lors de la liaison de la sonde sur les acides nucléiques à doubles brins.

### *Validation*

En ce qui concerne la représentativité du modèle cellulaire, la toxicité des rejets industriels a été étudiée avec le bioessai Truite et le MH (Figure 1). Les résultats montrent qu'il existe une corrélation significative entre les deux bioessais. Ainsi, le MH peut être employé comme test alternatif au bioessai Truite. De plus, la concordance générale était de 80 % de sorte que le MH peut prédire la présence de toxicité chez la Truite la plupart du temps. Les échantillons non concordants présentaient des effets à de faible dilution du rejet industriel avec le MH alors que le bioessai Truite ne montrait aucun signe de mortalité (faux positifs). Nous avons obtenu que très peu (1 / 60) de faux négatifs suggérant que la sensibilité du MH est adéquate chez la plupart des rejets. En d'autres mots, le MH était en général plus sensible que le bioessai Truite. De plus, le modèle hépatocyte peut être facilement transférable à des laboratoires qui réalisent sur une base régulière le bioessai Truite.

**Figure 1 - Prédiction des effets toxiques chez la Truite à partir du MH.**



CME0 : concentration minimale avec effet observé;  
CL<sub>50</sub> : concentration létale pour 50 % des poissons.

Cette corrélation tient pour les rejets provenant des quatre principaux secteurs économiques d'industries de la région du Québec : pâtes et papier, production de chimie organique (incluant les usines pétrolières), production de chimie inorganique et la métallurgie.

## LIMITES

Étant donné que les effluents industriels sont filtrés et que le milieu de culture est stabilisé à l'aide d'antibiotiques, la toxicité mesurée avec le MH provient de substances chimiques dissoutes. Le MH ne détecte que la toxicité générale des substances i. e., les effets toxiques qui affectent les fonctions fondamentales qui se retrouvent chez toute les cellules. Il est théoriquement possible que certaines substances perturbent certaines fonctions particulières tels le système nerveux ou immunologique par

exemple, qui peuvent compromettre la survie de l'organisme sans que le modèle cellulaire ne puisse les détecter. Cependant, selon les résultats de validation, nous avons obtenu très rarement un faux négatif avec le MH (i.e., absence d'effet avec l'hépatocyte mais présence de mortalité chez la Truite). De plus, il est généralement admis que les substances toxiques exercent leurs effets par le biais de plusieurs mécanismes que les cellules peuvent éventuellement mesurer. Malgré ces limites, le MH peut toujours être considéré comme test alternatif rentable et performant vis-à-vis du bioessai Truite.

## **UTILISATION DE L'ALTERNATIVE**

Il existe quatre considérations majeures qui peuvent influencer la façon d'employer l'alternative. Celles-ci sont : 1) les considérations éthiques, i. e., le désir de réduire le plus possible l'utilisation des animaux dans les essais écotoxicologiques, 2) les coûts, 3) le contexte de l'évaluation et 4) l'urgence d'obtenir les résultats. Par exemple, prenons un projet sur l'évaluation de l'efficacité d'un procédé industriel qui demanderait l'analyse de la toxicité d'une centaine d'échantillons. Advenant que nous désirons évaluer la toxicité vis-à-vis du poisson et ce, dans un délai rapide (10 jours) tout en voulant dépenser le moins d'argent et sacrifier le moins possible des poissons, nous pouvons utiliser le MH comme test de dépistage pour identifier les échantillons susceptibles d'être toxique ou non chez la Truite. Par contre, dans un contexte plus réglementaire, nous pourrions utiliser le MH pour cerner les rejets toxiques ou non et réaliser le bioessai Truite seulement sur les rejets qui se sont montrés toxiques avec l'hépatocyte afin de confirmer l'effet mortel chez la Truite. Selon cet exemple, le bioessai Truite

sacrifierait 1200 organismes tandis que le MH ne sacrifierait que 38 poissons en assumant qu'une préparation d'hépatocytes provenant de trois poissons (20 cm) serait nécessaire pour analyser la toxicité de 8 échantillons (ce qui est réaliste). Ainsi, on améliore la valeur éthique du bioessai Truite tout en réduisant les coûts, le volume de l'échantillon requis et le délai d'analyse.

## **CONCLUSIONS**

Une méthode alternative est proposée pour évaluer la toxicité létale des rejets industriels chez le poisson. Cette alternative consiste à utiliser une culture primaire d'hépatocytes de Truite. L'utilisation de cette alternative permet de réduire considérablement le sacrifice d'organismes dans les essais toxicologiques, le coût d'analyse, le temps d'exécution du bioessai. De plus, des études sur les effets sublétaux peuvent être réalisées plus facilement avec les hépatocytes. Ainsi, selon le contexte de l'évaluation de la toxicité des échantillons liquides d'origines industrielles ou municipales, le MH peut être utilisé comme test de substitution ou bien comme test complémentaire.

## **Informations**

Pour plus d'informations, veuillez vous adresser à :

Drs François Gagné ou Christian Blaise.  
Biologie de l'environnement,  
Centre Saint-Laurent  
105 McGill, Montréal, Qc, H2Y 2E7  
(514) 496-7101.