

## Dépistage d'agents mutagènes dans l'eau de mer \*

par James M. Parry

(Département de génétique, University College de Swansea)

*La tâche du toxicologue en génétique est de veiller à mettre l'homme à l'abri des produits mutagènes qui pourraient exister dans l'environnement. Ce risque est important dans la mer, les produits mutagènes qu'elle contient pouvant nous parvenir par les chaînes alimentaires. Les dépister dans ce milieu nécessite une longue et patiente recherche pour obtenir des tests de la sûreté voulue.*

Pour se diviser et perpétuer leur espèce, les organismes vivants ont besoin de l'information qui est conservée dans leurs gènes sous forme de séquences chimiques spécifiques de la molécule d'ADN, l'acide désoxyribonucléique. De nombreux systèmes enzymatiques se sont développés pour protéger cet ensemble d'information des dommages que peuvent causer les produits chimiques et les radiations, mais de temps en temps, il se produit des changements dans cette information, que l'on appelle des mutations. La figure 1 donne des exemples des mécanismes selon lesquels des changements dans la séquence de la molécule d'ADN peuvent induire des mutations, soit lorsque l'une des bases nucléiques de la chaîne de codage vient à changer, soit lorsqu'elle est ajoutée ou retirée.

### Tumeurs

Les preuves que les mutations peuvent aussi jouer un rôle important dans le développement des cancers chez l'homme, se sont accumulées. Les travaux de nombreux chercheurs, tels que le professeur Bruce Ames (U.S.A.), ont démontré que la très grande majorité des produits chimiques qui engendrent le cancer chez l'homme et l'animal, se comportent comme des mutagènes quand on les engage dans des essais biologiques convenables. Ces produits chimiques paraissent réagir, directement ou indirectement, avec l'ADN des organismes vivants en y produisant des changements de l'information codée. A leur tour, ces changements se répercutent dans les cellules somatiques, c'est-à-dire dans les cellules de l'organisme autres que celles qui sont liées à la reproduction, avec pour conséquence l'apparition possible d'une tumeur, ou encore la transmission du gène défectueux aux générations suivantes. Mais, jusqu'à présent, on n'a pas prouvé irréfutablement que le cancer décou-

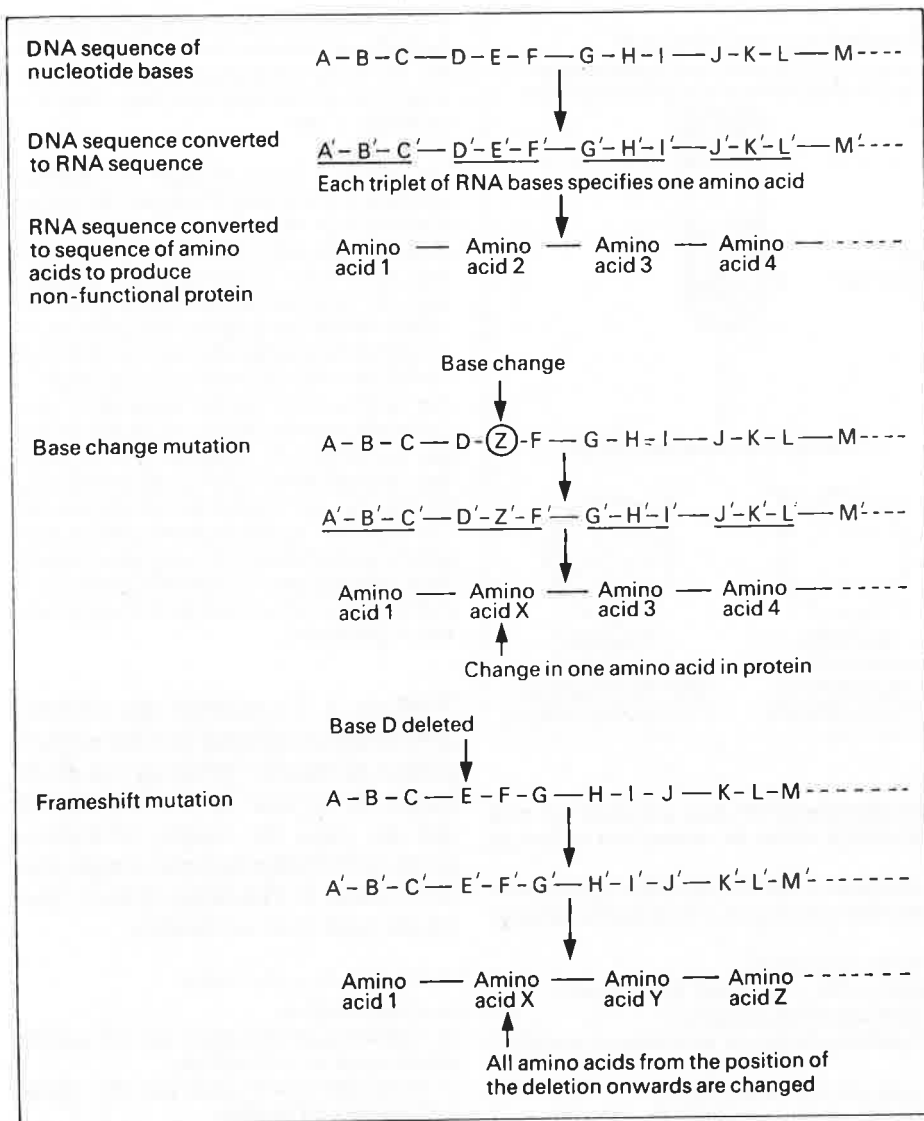
Dans tous les cas, au changement de l'information portée par l'ADN correspond un changement dans la chaîne des aminoacides de la protéine dont la synthèse est dirigée par l'information altérée.

Chez l'homme, les mutations sont généralement nuisibles car elles mènent à la synthèse de protéines défectueuses incapables de remplir le rôle de la protéine normale. De nombreux problèmes médicaux proviennent de défauts génétiques transmis à la suite de mutations passées. Parmi les désordres propres à l'espèce humaine et qui s'expliquent de la sorte, on peut citer la dystrophie myotonique, la cystite fibreuse, et l'hémophilie A, qui se rencontrent aux fréquences moyennes de 0,2, 0,5 et 0,1 pour mille individus nés vivants. On peut estimer qu'environ 30 % des personnes hospitalisées dans les pays développés le sont pour des troubles dans lesquels un défaut génétique joue un rôle plus ou moins important. La tâche du toxicologue en génétique est de s'assurer que la population humaine est protégée des agents qui, dans son environnement, feraient apparaître des mutations à un rythme plus élevé et qui incorporeraient ces mutations dans le patrimoine des générations futures.

le directement de mutations survenant dans les cellules somatiques; on sait seulement qu'il existe une étroite corrélation entre la faculté d'un produit chimique d'induire des mutations, et sa faculté d'induire le cancer. Les chercheurs de nombreux pays ont mis au point des systèmes de dépistages variés qui emploient la réaction d'un organisme pour mettre en évidence l'activité mutagénique d'un produit chimique donné présent dans l'environnement. Les organismes employés vont de la bactérie, qui est une cellule relativement simple, aux cultures de tissus de mammifères. Dans tous ces systèmes, le principe est d'exposer des cellules dont le génotype est connu à l'agent étudié, selon un certain processus. A l'issue de ce traitement, on recherche s'il s'est produit des mutations, en cultivant les cellules dans un milieu spécial, qui ne peut convenir qu'aux cellules transformées. Celles-ci seront les seules à se développer tandis que les autres dépériront.

Les systèmes les plus fréquemment employés dans nos laboratoires sont fondés sur l'em-

\* De Spectrum n° 162.



*Traduction du texte anglais*

- a) Séquence de bases nucléiques de l'ADN.
- b) Transcription dans la séquence correspondante d'ARN.  
Chaque triplet de bases de l'ARN spécifie un amino-acide particulier.
- c) Conversion de la séquence d'ARN en une séquence d'acides aminés constituant une protéine fonctionnellement correcte.
- d) Mutation par changement d'une base nucléique :
  - 1) Base changée,
  - 2) Amino-acide changé dans la séquence de la protéine.
- e) Mutation par glissement de séquence :
  - 3) La base D a disparu,
  - 4) A partir de cette position, tous les amino-acides de la chaîne sont différents.

**Figure 1. Principes de la mutation illustrant comment la chaîne des amino-acides est altérée par le changement ou la disparition d'une base nucléique dans la séquence correspondante d'ADN.**

ploi de bactéries ou de levures ayant déjà subi des mutations qui les rendent incapables de produire certains acides aminés, tels que l'histidine, et auxquelles on doit par conséquent fournir ces acides aminés pour assurer leur croissance. On dit que ces cellules sont auxotrophes. En présence de mutagènes, de telles cellules subissent de nouvelles mutations qui en font des cellules prototrophes, auxquelles il n'est plus nécessaire de fournir l'acide aminé particulier

précédent. Quand des cellules prototrophes sont incorporées à un milieu de culture qui ne contient pas l'acide aminé en question, elles croissent et forment des colonies que l'on peut dénombrer après une certaine période d'incubation à une température appropriée. D'une façon générale, le dénombrement des colonies prototrophes est considéré comme une évaluation du pouvoir mutagène du composé chimique testé.

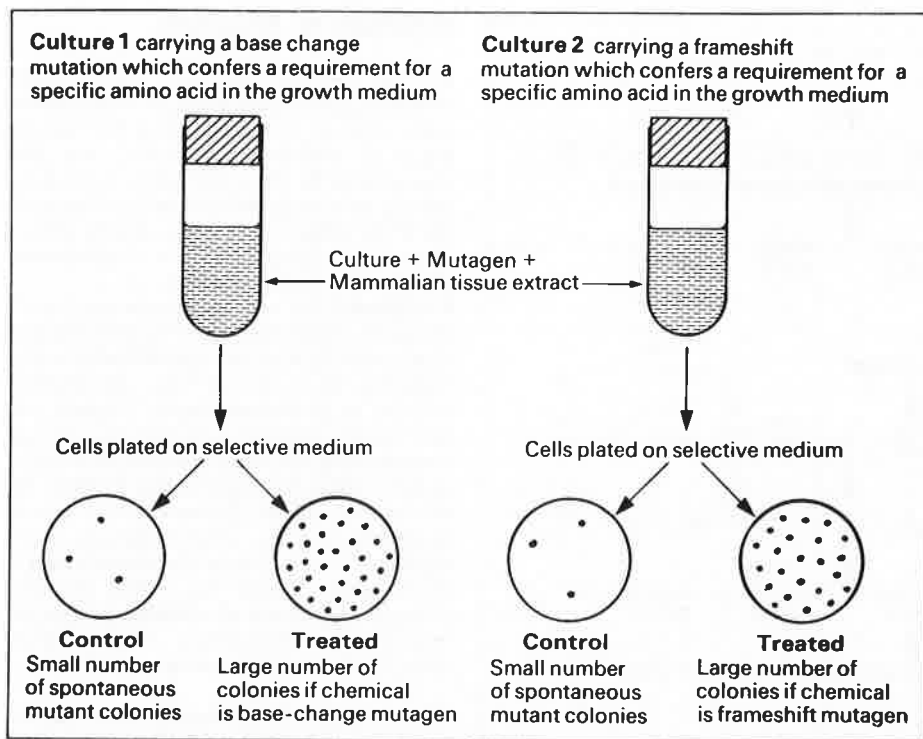
**Systèmes de détection**

Le type d'activité mutagène d'un produit chimique peut se déterminer par l'utilisation d'une série de souches d'essais pouvant se muter en cellules prototrophes, soit par changement de l'une des bases nucléiques, soit par un changement portant sur l'ensemble d'une séquence de bases, appelé glissement de la chaîne d'ADN. Ces altérations sont expliquées dans la figure 2. Évidemment les cellules simples des bactéries ne se comportent pas métaboliquement de la même façon qu'un mammifère dans son ensemble, de sorte que nous considérons qu'il est en général nécessaire d'opérer sur des extraits tissulaires pour simuler dans nos essais le métabolisme d'un mammifère. Nous utilisons plus particulièrement l'extrait de foie de mammifère. De nombreuses autres modifications sont venues s'ajouter pour augmenter la sensibilité des cellules à l'activité mutagène et pour les rendre capables d'absorber des molécules chimiques de grande dimension, mais de telles considérations débordent le cadre du présent article.

L'un des problèmes principaux posés par les sociétés industrielles dans lesquelles nous vivons, consiste à savoir se débarrasser des déchets. La mer a servi et sert encore à la décharge délibérée et accidentelle des produits chimiques, et il se peut que certains d'entre eux, en très petit nombre, ont vu l'espérer, soient des toxiques génétiques se montrant capables de provoquer des mutations dans les organismes vivants au contact desquels ils se trouvent. De tels dommages peuvent occasionner des changements dans l'architecture génétique des êtres marins. Les proportions relatives de certains de leurs gènes peuvent changer, ou exister sous des formes différentes, et comme ces tissus modifiés font partie de l'alimentation de l'homme, celui-ci se trouverait exposé, sans le savoir, aux risques inhérents à de telles modifications. Aussi avons nous décidé, il y a quelques années, d'étudier s'il pouvait se trouver dans l'eau de mer des agents mutagènes capables d'être un danger à la fois pour l'homme et pour la vie marine.

On peut envisager la recherche des mutagènes dans l'eau des mers et des océans par des procédés largement différents dans leurs principes. La démarche la plus compliquée, et empreinte d'une certaine naïveté scientifique, consisterait à analyser des échantillons d'eau, en cherchant à identifier tous les composés chimiques présents, puis à tester individuellement leur pouvoir mutagène en utilisant les systèmes d'indicateurs déjà mentionnés. Ce serait une tâche d'une formidable ampleur, car il se trouve dans ces échantillons un grand nombre de substances chimiques, naturelles ou provenant de l'activité de l'homme, et toutes devraient être considérées avec attention. Ce serait aussi une méthode coûteuse. Des programmes de ce genre ont été entrepris aux États-Unis d'Amérique sur une gamme de plus de 300 substances qui ont été trouvées dans l'eau potable.

Une seconde manière de procéder pourrait consister à prélever des échantillons d'eau de



#### Traduction du texte anglais

**Culture 1.** Les cellules ont subi une mutation par changement de base nucléique qui rend indispensable la présence d'un certain acide aminé dans le milieu de culture pour assurer la croissance.

**Culture 2.** Les cellules ont subi une mutation par amputation d'une base nucléique et glissement de séquence d'ADN qui rend indispensable la présence d'un certain acide aminé dans le milieu de culture pour assurer la croissance.

a) Culture + agent mutagène + extrait tissulaire de mammifère.

b) Cellules déposées sur un milieu de culture dépourvu de l'acide aminé discriminant.

Témoin : petit nombre de colonies prototrophes apparues spontanément.

Test : grand nombre de colonies prototrophes si l'agent mutagène est actif dans le remplacement d'une base.

Témoin : petit nombre de colonies prototrophes apparues spontanément.

Test : grand nombre de colonies prototrophes si l'agent mutagène est actif dans le glissement par amputation d'une base.

#### Figure 2. Processus des essais de recherche d'activité mutagène.

mer et d'océan, à concentrer les produits chimiques qui s'y trouvent, puis à exposer une gamme de systèmes biologiques de dépistage aux liqueurs concentrées ainsi obtenues. Mais une telle façon de faire souffre d'au moins deux limitations fondamentales, l'une chimique et l'autre biologique.

Les méthodes de concentration soulèvent des problèmes considérables parce que les échantillons renferment un grand nombre de composés dont la stabilité est inconnue. Ces échantillons peuvent aussi contenir des substances qui sont des poisons pour les systèmes vivants utilisés dans les essais mutagéniques. Si les liqueurs concentrées contenaient à la fois des mutagènes et des poisons actifs, les cellules mutantes seraient tuées, et on aboutirait à l'interprétation erronée qu'il n'y a pas d'agent mutagène dans l'échantillon.

#### Organismes relais

Nous avons essayé de surmonter les problèmes fondamentaux de la seconde démarche en mettant à profit la propriété bien connue

qu'ont de nombreux organismes marins de concentrer dans leurs tissus certains composés chimiques présents à l'état de traces dans leur environnement. Par ce biais, on se prémunit aussi contre l'effet de masque d'une activité toxique car il est raisonnable d'estimer qu'une action toxique aurait déjà tué l'organisme relais.

Au cours de notre travail initial, conduit avec M. Al-Mossawi venu d'Irak, après son diplôme, pour effectuer un travail de recherche, nous avons ramassé une variété comestible de moules, *Mytilus edulis*, dans une série de lieux où l'eau était claire, et dans d'autres, proches d'installations industrielles, où la pollution était apparente. Pour chaque lot de moules, les tissus ont été extraits à l'aide de divers solvants organiques, et ces extraits ont été filtrés sur des filtres à pores assez fins pour retenir toutes les bactéries (Figure 3). Enfin, ces extraits ont servi à plusieurs types de tests d'activité mutagène analogues à celui que nous avons déjà décrit. Au début de ce travail, les extraits tissulaires étaient obtenus par l'alcool éthylique, et il nous a été possible de voir que les

moules ramassées près de certains sites industriels contenaient des produits mutagènes dans leurs tissus, tandis que celles que nous avons ramassées dans l'eau claire n'en contenaient pas.

Le tableau I est un exemple des résultats obtenus. Il présente le classement de moules ramassées en des points de plus en plus éloignés de la zone industrielle de Swansea Bay, vers l'Ouest. Le test est celui de l'apparition de colonies phototrophes dans une culture de cellules de levure. Initialement ces cellules ne pouvaient effectuer la synthèse de l'histidine et du tryptophane, et la mutation prototrophe a été estimée séparément pour chacun de ces deux acides aminés. Il est clair que les moules de Mumbles et de Caswell Bay, les deux sites les plus proches de la zone industrielle, ont produit des accroissements très nets de transformation prototrophe, tandis que les moules des sites plus éloignés de la zone industrielle (Oxwich, Port Eynon et Rhossilli) n'ont produit aucune augmentation significative.

**Tableau 1. Comptages des colonies prototrophes induites par les extraits totaux de moules ramassées en divers points de la zone de Gower, dans le sud du pays de Galles. Primitivement, les cellules de levure employées nécessitent de l'histidine et du tryptophane pour leur croissance.**

#### Traduction du texte anglais

a) Origine du lot.

b) Mutations prototrophes par  $10^5$  cellules relativement au tryptophane.

c) Mutations prototrophes par  $10^5$  cellules relativement à l'histidine.

d) Témoin 1.

e) Témoin 2.

f) Mumbles.

g) Caswell Bay.

h) Oxwich.

i) Port Eynon.

j) Rhossilli.

Treatment	trp prototrophs per $10^5$ treated cells	his prototrophs per $10^5$ treated cells
Control 1	19.7 ± 1.9	7.1 ± 1.2
Control 2	24.2 ± 2.2	8.9 ± 1.3
Mumbles	621.4 ± 11.1	247.5 ± 7.0
Caswell Bay	492.9 ± 7.0	132.0 ± 3.6
Oxwich	34.2 ± 1.8	15.1 ± 1.2
Port Eynon	29.0 ± 1.7	9.2 ± 0.9
Rossilli	31.3 ± 2.5	6.4 ± 1.1

#### Amélioration des tests

Nous nous sommes aperçus très tôt au cours de ces études que les systèmes biologiques servant à ces tests ne donnaient guère satisfaction sous la forme où nous les mettions en œuvre, et qui consiste, comme il est normal de le faire, à cultiver les cellules après leur

traitement sur des couches d'agar-agar ne contenant pas les acides aminés discriminants.

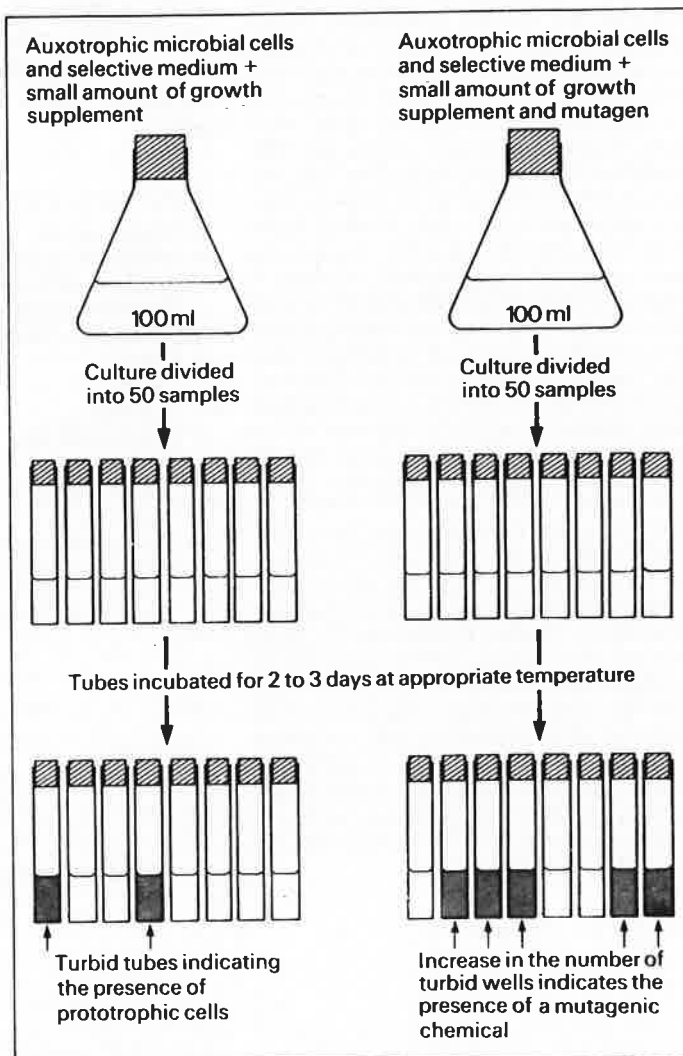
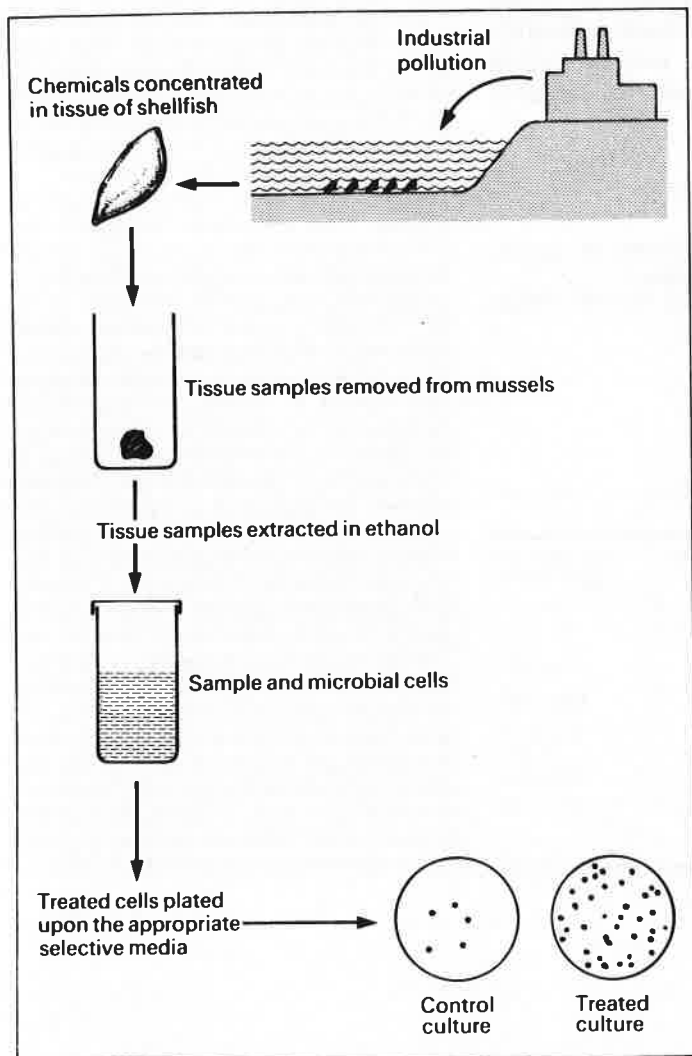
Le problème est que les extraits tissulaires contiennent, le plus souvent, de petites quantités de ces acides aminés discriminants. Dans ces conditions, les cellules auxotrophes peuvent accomplir quelques divisions, ce qui augmente la probabilité d'apparition spontanée de mutants. Cet effet peut masquer celui d'une activité mutagène faible, bien que son importance soit probablement négligeable quand l'activité mutagène est forte. Nous en sommes arrivés à conclure que les cultures

sur agar-agar, et plus particulièrement quand l'acide aminé discriminant est l'histidine, mènent à des tests peu « robustes », qui ne conviennent pas aux essais d'extraits tissulaires.

On peut imaginer de nombreux perfectionnements pour contrecarrer l'entraînement d'acides aminés discriminants dans les extraits tissulaires. Il est possible, par exemple, de mettre en œuvre des techniques d'extraction qui n'entraînent pas les acides aminés ou d'envisager l'emploi des souches auxotrophes insensibles aux acides aminés entraînés dans les liqueurs extraites. Bien que nous

ayons recouru à l'une et à l'autre de ces solutions, nous avons trouvé que le remède le plus efficace était d'améliorer la robustesse du test.

Nous avons arrêté notre choix sur une évaluation par fluctuation, selon la technique largement perfectionnée par Michael Green, du Conseil de la recherche médicale (Unité des mutations cellulaires, Brighton). Sous la forme la plus simple, cette technique consiste à mélanger des cellules d'une culture de micro-organismes auxotrophes avec une petite quantité des acides aminés discriminants, dans un milieu contenant le réactif à



*Traduction du texte anglais*

- Polluants industriels.
- Produits chimiques concentrés dans les tissus des moules.
- Tissus de moules disséqués.
- Extraction des tissus par l'éthanol.
- Liqueur d'extraction et cellules microbiennes.
- Après traitement, les cellules sont déposées sur un milieu de culture approprié, en boîte de Pétri.
- Témoin.
- Test.

**Figure 3. Emploi de moules comme organismes relais pour concentrer les produits chimiques dans un dépistage d'agents mutagènes d'origine chimique.**

*Traduction du texte anglais*

- Cellules microbiennes auxotrophes + milieu de culture dépourvu d'acides aminés discriminants + petites quantités de ces acides aminés.
- Lot témoin, divisé en 50 échantillons.
- Cellules microbiennes auxotrophes + milieu de culture dépourvu d'acides aminés discriminants + petites quantités de ces acides aminés + agent mutagène.
- Lot d'essai, divisé en 50 échantillons.
- Tubes incubés pendant 2 ou 3 jours, à température voulue.
- Mutations prototrophes spontanées, indiquées par le trouble du milieu.
- Un plus grand nombre de tubes troubles indique des mutations prototrophes induites par l'agent mutagène.

**Figure 4. Principe de l'analyse du pouvoir mutagène par fluctuation.**

étudier. On divise ensuite ce mélange en 50 échantillons de chacun 2 millilitres qui sont incubés simultanément à la température voulue. Durant cette incubation, les cellules restées auxotrophes se divisent deux ou trois fois puis cessent de se diviser quand la petite quantité d'acides aminés discriminants se trouve épuisée. Au contraire, s'il existe des cellules devenues prototrophes, elles peuvent se diviser continuellement, ce

qui produit une apparence de trouble dans le liquide de culture. Quand le mélange initial contient un agent mutagène, il se forme une quantité accrue de cellules prototrophes, et le nombre de tubes de culture d'apparence trouble est plus grand que dans le lot témoin. On évalue simplement l'activité mutagène en comparant le nombre de tubes à apparence trouble dans le lot étudié et dans le lot témoin (Figure 4).

Selon ce principe, et en ajustant convenablement la quantité ajoutée d'acides aminés discriminants, deux étudiants diplômés, Munira Kadhim, d'Irak et William Barnes, des États-Unis, ont prouvé, dans nos laboratoires, qu'un tel test convenait idéalement bien au dépistage à partir d'extraits tissulaires, et qu'il était très « robuste ».

## Dans le manteau

Dans nos premiers essais qui tendaient à démontrer la présence de produits mutagènes dans les moules, nos extraits étaient préparés à partir de la totalité de l'organisme. La question suivante était de rechercher si les mutagènes se localisaient ou non dans un tissu particulier de l'animal. Dans ce but, nous avons préparé des extraits des différents tissus de l'animal après dissection, avec pour solvant l'éthanol. Les liqueurs extraites ont ensuite été testées, séparément, à la fois avec la levure et les bactéries. Nous avons ainsi considéré séparément le manteau, le muscle, le pied, l'hépatopancréas et le système reproducteur. Il est indubitable d'après nos résultats que l'activité mutagène se localise dans le manteau. Avec des cellules de levure comme indicateur les extraits de manteau produisent de huit à onze fois plus de colonies prototrophes à la fois pour l'histidine et pour le tryptophane (Tableau 2).

Les méthodes précédentes ont aussi servi, après modification, à tester l'activité mutagène des contaminants à métaux lourds qui se concentrent dans les tissus des moules. Al-Mossawi et Munira Kadhim ont pu réunir des preuves convaincantes montrant que les extraits tissulaires des moules contaminées par des métaux lourds témoignent d'une forte activité mutagène décelable par les tests de fluctuation. Comme pour les mutagènes organiques, les mutagènes à métaux lourds se concentrent dans le manteau, quoiqu'on en trouve aussi dans d'autres tissus, mais en quantités moindres.

**Tableau 2. Résultats des traitements d'une souche de cellules de levure auxotrophes relativement à l'histidine et au tryptophane avec les extraits de divers tissus de moules contaminées.**

*Traduction du texte anglais*

- a) Origine du lot.
- b) Mutations prototrophes par  $10^5$  cellules relativement au tryptophane.
- c) Mutations prototrophes par  $10^5$  cellules relativement à l'histidine.
- d) Témoin.
- e) Muscle.
- f) Manteau.
- g) Hépatopancréas.
- h) Pied.
- i) Système reproducteur.

Treatment	trp prototrophs per $10^5$ treated cells	his prototrophs per $10^5$ treated cells
Control	19.1 ± 1.8	36.7 ± 2.3
Muscle	16.6 ± 1.4	41.0 ± 2.9
Mantle	135.7 ± 8.7	589.6 ± 23.4
Hepatopancreas	27.9 ± 1.5	41.6 ± 2.7
Foot	17.6 ± 0.9	39.4 ± 2.1
Reproductive system	14.3 ± 2.3	20.7 ± 1.9

Nous avons également utilisé les méthodes mises au point pour les moules pour des dépistages impliquant d'autres organismes relais. William Barnes s'en est servi avec succès pour une variété d'algues, et j'ai pu montrer que ces méthodes conviennent aussi aux huîtres, aux palourdes et aux extraits de foie de poissons, grâce à des tissus fournis par des collaborateurs des États-Unis.

Toutefois, ces essais se bornent à prouver la présence d'un constituant possédant une activité mutagène. Bien qu'on puisse en tirer indirectement des renseignements sur le mécanisme de cette activité mutagène, on ne doit en espérer aucune information directe sur la nature de l'agent. Mais on dispose, par ailleurs, d'une gamme de procédés chimiques pour séparer les constituants des extraits biologiques, par exemple en s'appuyant sur des différences de solubilité, de sorte que le fonctionnement des extraits par différents solvants est intéressant à considérer. Des séparations de ce type simplifient considérablement l'analyse, et l'on peut espérer découvrir ainsi l'identité chimique de n'importe quel constituant mutagène actif. Une fois connue la composition des fractions actives, l'utilisation des tests mutagènes à microbes indicateurs permet de chiffrer l'activité propre de chaque composant. Parallèlement, de telles études peuvent être étendues aux essais impliquant des cellules de mammifères qui semblent être des indicateurs plus proches de la toxicité génétique à l'égard de l'homme. C'est dans cette direction que nous espérons développer nos recherches dans l'avenir.